

**GRUNDLAGEN EINER METHODE ZUR
ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN
AUS RATTENLEBER
IN NICHTWÄSSRIGEN MEDIEN**

Peter Schmucker

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0064

Aus dem Institut für physiologische Chemie, physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Vorstände: Prof.Dr.Dr.h.c.Th.Bücher - Prof.Dr.E.M.Klingenberg
Prof.Dr.F.Miller - Prof.Dr.H.G.Zachau

GRUNDLAGEN EINER METHODE ZUR ISOLIERUNG
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENLEBER
IN NICHTWÄSSRIGEN MEDIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Schmucker
aus
Nürnberg

Jahr
1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H.-W. Heldt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.1975



Für die Überlassung des Themas und die fachkundige
Anleitung auf theoretischem wie experimentellem
Gebiet gebührt mein herzlichster Dank Herrn
Priv. Doz. Dr. H.-W. Heldt.

Herrn Prof. Dr. U. Heber danke ich für die unserer
Arbeit so wichtige Unterstützung durch seine
langjährige Erfahrung.

Für die tatkräftige Hilfe bei den experimentellen
Arbeiten danke ich Frau Helga Wiese aufrichtig.

Inhaltsverzeichnis

- I. EINLEITUNG
- II. ÜBERBLICK ÜBER DIE BISHERIGE ANWENDUNG DER NICHTWÄSSRIGEN ZELLFRAKTIONIERUNG UND EINIGE DAMIT ERZIELTE ERGEBNISSE
 1. Isolierung von Zellkernen
 - a) Entwicklung der Methode
 - b) Weiterentwicklungen und Abwandlungen der Methode
 - c) Verschiedene Anwendungsgebiete der nichtwässrigen Zellkernpräparation
 2. Isolierung von Chloroplasten
 3. Isolierung von Mitochondrien
- III. METHODISCHE ARBEITEN UND ERGEBNISSE
 1. Gefriertrocknung
 2. Auswahl und Präparation der unpolaren Medien
 3. Homogenisation
 4. Fraktionierung
- IV. DISKUSSION
 1. Gefrierstop
 2. Lyophilisierung
 3. Homogenisierung
 4. Fraktionierung
 5. Analyse der Fraktionen auf ihren Gehalt an Zellorganellen
 6. Ausblick
- V. METHODEN
 1. Gewinnung des Ausgangsmaterials
 2. Vorbereitung der Proben zum Test
 3. Optisch-enzymatische Bestimmungen
 - a) Bestimmung der Enzymaktivität
 - b) Substratbestimmung
 4. Proteinbestimmung
 - a) Biuretbestimmung
 - b) Bestimmung nach Lowry
- VI. LITERATURVERZEICHNIS
- VII. LEBENSLAUF

EINLEITUNG

Es darf als erwiesen gelten, daß die tierische Zelle im Wesentlichen in nur zwei metabolische Kompartimente unterteilt ist: Einerseits Hyaloplasma mit Kernmatrix, andererseits der von der inneren Mitochondrienmembran umgrenzte Raum (Siebert, 1961).

Verschiedene Schlüsselsubstanzen werden durch spezifischen Transport an der inneren Mitochondrienmembran zwischen diesen beiden Kompartimenten hin- und herbefördert. Dadurch erfolgt die Regelung und Koordination des intrazellulären Stoffwechsels (Klingenberg, 1970, Heldt, 1972). Das Studium der metabolischen Vorgänge auf zellulärer Ebene erfordert die Kenntnis der Enzymaktivitäten und der Substratspiegel in beiden Räumen.

Es gibt zwei verschiedene Wege, sich der Untersuchung von subzellulären Partikeln und insbesondere von Mitochondrien zu nähern: Die "in-vitro-Technik" und die "in-vivo-Technik".

Bei der ersteren Methode, der "in-vitro-Technik", werden nach Homogenisation eines Organs die subzellulären Partikel wässrig isoliert. Das heißt, zunächst wird die Zellstruktur aufgelöst und sodann die in der Zelle enthaltenen Organellen gleichsam extrahiert. Diese "Extraktion" erfolgt durch Aufarbeiten des Homogenats in wässrigen Lösungen.

Im Gegensatz dazu arbeitet die "in-vivo-Technik" (Behrens, 1932) mit gefriergetrocknetem Zellmaterial. Homogenisierung und Aufarbeitung zu Fraktionen subzellulärer Partikel erfolgen in organischen, unpolaren Lösungsmitteln.

Zunächst mag die Nomenklatur "in vitro" und "in vivo" unklar erscheinen: Ist doch eine Behandlung des biologischen Materials mit organischen Lösungsmitteln weit unphysiologischer als die Arbeit in wässrigen, zudem dem ursprünglichen Zellmilieu oft angepassten Lösungen. Erst durch genauere Betrachtung wird der wesentliche Unterschied klar.

Die meisten der nach Fraktionierung untersuchten Substanzen, Enzyme wie Substrate, sind gut wasserlöslich. Es ist demnach nicht auszuschließen, daß während der wässrigen Präparation Verschiebungen der Konzentration von Enzymen wie Substraten zwischen den Kompartimenten auftreten. Nach vorangegangenen Untersuchungen an Zellkernen und Chloroplasten (z.B. Stern und Mirsky, 1953) muß dies vielmehr als sicher angenommen werden. Andererseits erfordert die Isolation von Zellorganellen gleich nach welcher Technik stets eine Zerstörung der Organ- und Zellintegrität, eine Homogenisation. Liegen die Zellbestandteile dabei in wässriger Lösung und bei normaler Temperatur vor, so muß mit dem Ablaufen einer Fülle von Reaktionen, physiologischen wie unphysiologischen, gerechnet werden. Dies gilt ebenso für die weitere Aufarbeitung. Insbesondere werden durch das Abbrechen der Energiezufuhr die anabolen Vorgänge stark verlangsamt, wohingegen die katabolen überhandnehmen und nur durch das Arbeiten bei tiefen Temperaturen hintangehalten werden können. Die durch wässrige Isolation gewonnenen Fraktionen entsprechen demnach vor allem in ihrem Metabolitgehalt nicht mehr einem Zustand, wie sie ihn in situ innehatten.

Dagegen bleibt durch die Aufarbeitung bei möglichst physiologischen Bedingungen das Zellprotein und das Enzymmuster weitgehend unangetastet, vor allem bezüglich der membrangebundenen und damit nicht ohne weiteres extrahierbaren Enzyme. Man erhält also auf diese Weise

gut funktionierende Zellorganellen. Für das Studium der Funktion dieser Organellen ist weiterhin der eben erwähnte "Mangel", daß die Substratspiegel nicht mehr ihrem in-vivo-Niveau entsprechen, keineswegs ein Nachteil. Die Prüfung der Funktion erfordert ja gerade das Schaffen von vielen variablen Metabolitkonzentrationen in vitro, wie sie in der Zelle möglicherweise niemals vorkommen. Nur so lassen sich die Eigenschaften beispielsweise eines Carriers bezüglich Kinetik, Inhibition etc. genau prüfen.

Genauere Rückschlüsse auf den Zustand der Zellorganellen in situ und vor allem auf ihren physiologischen Metabolitgehalt erlaubt die "in-vivo-Technik". Sie vermeidet die diesbezüglichen "Mängel" der wässrigen Methode. Der Stoffwechsel der Zelle bzw. des ganzen Organs wird - durch Gefrierstop - schlagartig angehalten und fixiert. Das gefriergetrocknete Material wird wasserfrei in organischen Lösungsmitteln homogenisiert und fraktioniert. Eine Extraktion der wasserlöslichen Substanzen und weitere chemische Reaktionen während der Aufarbeitung sind ausgeschlossen.

Es kann jedoch nicht erwartet werden, daß das Enzymmuster völlig unverändert bleibt. Besonders bei Enzymen, die lipidlöslicher Cofaktoren bedürfen, muß mit einem Aktivitätsverlust gerechnet werden. Man kann also nicht erwarten, mit dieser Technik voll funktionsfähige Zellorganellen zu erhalten, die sich etwa für in-vitro-Experimente eignen würden.

Zusammenfassend kann der Unterschied zwischen den beiden Techniken etwa so nochmals formuliert werden: Die wässrige Präparation gelangt zu funktionellen Zellpartikeln, welche ein Studium ihrer Eigenschaften in vitro erlauben.

Die nichtwässrige Technik bietet analytische Zellfraktionen, welche eine Messung der Metabolitspiegel in vivo ermöglichen.

Nach vorangegangenen Arbeiten an Zellkernen und Chloroplasten in vivo (s.u.) war es bereits gelungen, Mitochondrien aus Flugmuskeln von Heuschrecken nichtwässrig zu isolieren (Cerkasow und Foustka, 1966). Dieses Ergebnis bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Das Ziel war, eine Technik zu Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber auf nichtwässrigem Wege zu entwickeln, welche es ermöglichen würde, insbesondere die energiereichen Adeninnucleotide in vivo zu messen und so entsprechende in-vitro-Arbeiten (z.B. Pfaff und Heldt, 1969; Klingenberg et al., 1969) zu ergänzen.

Es erschien zunächst schwierig, die Präparationstechnik vom Flugmuskel der Heuschrecke auf die Rattenleber zu übertragen. Zum einen unterliegt das sehr viel größere Organ bei Gefrierstop anderen Bedingungen (s.u.) und zum anderen ist der Mitochondriengehalt der Leber nur etwa halb so hoch wie der des Heuschreckenflugmuskels. Trotzdem ist es in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten erstmalig gelungen, Rattenlebermitochondrien nichtwässrig zu isolieren.

ÜBERBLICK ÜBER DIE BISHERIGE ANWENDUNG DER NICHTWÄSSRIGEN ZELLFRAKTIONIERUNG UND EINIGE DAMIT ERZIELTE ERGEBNISSE ^x

1. Isolierung von Zellkernen

a) Entwicklung der Methode

Am Anfang der nichtwässrigen Zellfraktionierung standen Experimente mit Zellkernen. Die Methode soll, wie sie in der entsprechenden ersten Veröffentlichung (Behrens, 1932) angegeben ist, hier kurz skizziert werden.

Die in Äther-Trockeneis gefrorenen, etwa kirschgroßen Organstücke werden in einem Exsikator über konzentrierter Schwefelsäure bei etwa -20°C getrocknet und zunächst ohne Flüssigkeitszusatz im Fleischwolf und in einer Kugelmühle, dann in einer weiteren Kugelmühle unter Benzol zerkleinert. Aus dem entstandenen Homogenat wurden sodann durch mehrere Differentialzentrifugationen in verschiedenen Gemischen von Benzol und Tetrachlorkohlenstoff eine Kernfraktion und eine Protoplasmafraktion gewonnen und deren Reinheit mikroskopisch kontrolliert. Die erhaltenen Fraktionen wurden der jeweils vorgesehenen Untersuchung zugeführt.

b) Weiterentwicklungen und Abwandlungen der Methode

Es kann davon ausgegangen werden, daß bei jeder neuen untersuchten Gewebeart die Methode modifiziert werden mußte. Auf diese geringfügigen Ver-

^{x)} Eine Übersicht über die Anwendung der nichtwässrigen Fraktionierung bis 1956 findet sich bei Oster und Pollister, 1956.

Änderungen soll nicht eingegangen werden. Vielmehr sollen hier die jeweiligen Abwandlungen nur in ihren wesentlichen Punkten kurz umrissen werden.

Der hauptsächliche Fortschritt der ersten größeren Modifikation der Methode (Dounce et al., 1950) bestand in der Einführung einer regelrechten Gefriertrocknung. Daneben wurde die Kugelmühlen-Homogenisation nur noch unter Flüssigkeitszusatz durchgeführt und statt Benzol als leichtes Medium Petroläther verwendet.

Die nächste Weiterentwicklung (Allfrey et al., 1952) strebte eine Verallgemeinerung der Technik an. Es wurden nur gering differierende Methoden für verschiedene Gewebsarten einer Vielzahl von Tierspezies angegeben. Die wesentliche Veränderung der allgemeinen Methode war die Einführung des flüssigen Stickstoffs zum Gefrieren der in toto entnommenen und in Stücke von etwa 5 cm geschnittenen Organe. Die Trennung erfolgte wieder durch Differentialzentrifugation, diesmal in verschiedenen Gemischen von Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff.

Zur Homogenisation wurde statt der Kugelmühle später auch ein Potter-Elvehjem-System verwendet (Kay et al., 1956). Von dieser Möglichkeit machten jedoch nicht alle Autoren Gebrauch. Dagegen wurde die statt der komplizierten mehrfachen Differentialzentrifugation eingeführte Dichtegradientenzentrifugation (Fischer, Siebert und Adloff, 1959) allgemein übernommen (z.B. Hammel und Bessmann, 1964). Mit der Einführung der Frierstop-Technik (Wollenberger, Krause und Wahler, 1958) fand die methodische Entwicklung

einen vorläufigen Abschluß (Fischer, Siebert und Adloff, 1959). Durch die Angabe neuer strenger Reinheitskriterien (Siebert et al., 1965) wurde sie ergänzt.

Nur kurz erwähnt werden soll eine stark abgewandelte Methode (Behrens, 1954; Kopac, 1955). Dabei wurde das zu trennende Gewebe direkt in Paraffinöl emulgiert und die entstandenen Tropfen der dispersen Phase mit ihrem unterschiedlichen Gehalt an subzellulären Partikeln durch Zentrifugation nach Größe und Gewicht getrennt. Diese Methode konnte sich, soweit bekannt, nicht durchsetzen.

c) Verschiedene Anwendungsgebiete der nichtwässrigen Zellkernpräparation

α) Elementaranalysen

Die ersten Zellkernpräparationen, gewonnen aus dem Myokard des Kalbes, dienten der Elementaranalyse (Behrens, 1932). Ebenfalls verascht und der Elementaranalyse unterworfen wurden aus Pferdemiß nichtwässrig isolierte Hämosiderinpartikel (Behrens, 1933) und Kolloid- und Kernfraktionen aus Schweineschilddrüsen (Behrens, 1935).

β) Anwendung auf Pflanzenzellkerne

Die nichtwässrige Zellfraktionierung spielte auch eine gewichtige Rolle bei der Erforschung der Zusammensetzung und des Stoffwechsels der pflanzlichen Zelle. Die erste Voraussetzung wurde durch die Entwicklung einer speziellen Mühle zur Homogenisation von Pflanzenzellen

geschaffen (Feulgen und Behrens, 1935). Als wichtiger Beitrag zur Kenntnis der Rolle der Nukleinsäuren wurde die "in pflanzlichen Zellkernen vorkommende Nukleinsäure" (Feulgen, Behrens und Mahdihassan, 1937) als DNA identifiziert. Vorher hatten ja die DNA als "tierische Thymonukleinsäure" und die RNA als "pflanzliche Hefenukleinsäure" gegolten. Ergänzend dazu gelang die Isolation von RNA aus dem rein dargestellten Cytoplasma von Roggenkeimen (Behrens, 1938).

Spätere Veröffentlichungen über Pflanzenzellen befassen sich vor allem mit der Enzymverteilung zwischen Kern und Plasma (z.B. Stern und Mirsky, 1952) und sollen daher unter diesem Stichwort erwähnt werden.

*) Untersuchung der Enzymverteilung zwischen Kern und Plasma

Die Erforschung der Enzymverteilung in der Zelle bildete ohne Zweifel das Hauptanwendungsgebiet der nichtwässrigen Technik. In den gleichen Veröffentlichungen werden bisweilen auch Substratverteilungen untersucht. Solche "gemischten" Publikationen sollen an dieser Stelle angeführt werden.

Auch dieses Gebiet wurde zuerst vom "Stammvater" der nichtwässrigen Fraktionierung mit einer Untersuchung der "Verteilung der Lipase und Arginase zwischen Zellkern und Protoplasma" beschritten(Behrens, 1939).

Die oben erwähnte allgemeinere Technik (Allfrey et al., 1952) erlaubte es, vergleichende Studien bezüglich der Enzymverteilung an verschiedenen Geweben verschiedener Tier-

spezies zu unternehmen (Stern und Mirsky, 1952). Es konnten hohe Aktivitäten von Enzymen des Nucleosidstoffwechsels in fast allen untersuchten Kerntypen nachgewiesen werden. Vergleiche zwischen wässrig und nichtwässrig isolierten Zellkernen erbrachten zwei wichtige grundsätzliche Ergebnisse (Stern und Mirsky, 1953):

1. Bei der wässrigen Methode werden erhebliche Mengen verschiedener Enzyme aus dem Kern extrahiert.
2. Die Aktivität der getesteten Enzyme erfährt bei nichtwässriger Isolation kaum eine Einbuße.

Untersuchungen der Verteilung von verschiedenen einzelnen Enzymen sollen nur kurz erwähnt werden. Folgende Enzyme wurden betrachtet:

Adenosintriphosphatasen (Fischer, Siebert und Adloff, 1959; Siebert und Adloff, 1960)

DNA-Nucleotidyltransferase (Keir, Smellie und Siebert, 1962)

Ribonuclease (Giannitsis et al., 1967)

Lactatdehydrogenase (Siebert und Hannover, 1963)

Wichtiger für die Rolle des Kerns im Gesamtstoffwechsel des Kernes ist die Betrachtung ganzer Enzymsysteme. Obgleich bestimmte Cytochrome im Zellkern nachgewiesen werden konnten (Conover und Siebert, 1965), wurde durch das Fehlen des Flavoproteinsystems (Stern und Timonen, 1955) ein aerober Stoffwechsel des Kerns weitgehend ausgeschlossen. Dagegen konnte gezeigt werden, daß der Kern einen lebhaften anaeroben Stoffwechsel aufweist: Zuerst wurden einzelne Enzyme der

Glycolyse im Kern gefunden (Stern und Mirsky, 1952), später wurden sämtliche Enzyme, Substrate, und Cofaktoren der Glycolyse im Zellkern nachgewiesen (Siebert, 1961). Dadurch wurde eine Einbeziehung des Kerns in den löslichen Raum der Zelle (als Gegensatz der mitochondrialen Matrix) hochwahrscheinlich gemacht. Dieses Ergebnis ist auch für die vorliegende Arbeit grundlegend.

8) Untersuchung der Verteilung von Metaboliten zwischen Kern und Plasma

Die meisten Veröffentlichungen auf diesem Gebiet befassen sich mit der Metabolitverteilung ergänzend zu Enzymbestimmungen (z.B. Siebert, 1961) und werden deshalb oben erwähnt. Wichtig für die Rolle des Kerns im Zellstoffwechsel sind vor allem zwei Veröffentlichungen. Die befaßt sich mit der Verteilung der freien Aminosäuren (Dounce et al., 1950), die andere mit der Mononucleotidverteilung (Osawa, Allfrey und Mirsky, 1957). Es wird gezeigt, daß sowohl Aminosäuren als auch Mononucleotide in Kern und Plasma praktisch keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede aufweisen, daß also der Kern auch bezüglich dieser Metaboliten in den löslichen Raum der Zelle einbezogen ist.

9) Untersuchung der Elektrolytverteilung zwischen Kern und Plasma

Da sich bei wässriger Zellfraktionierung der Elektrolytgehalt der isolierten Zellkerne weitgehend dem umgebenden Medium anpaßt, stellt die unpolare Präparation den einzigen Weg dar,

den wirklichen Elektrolytgehalt des Kerns direkt zu messen.

Bereits relativ früh waren Erdalkalisalze im Zellkern bestimmt worden (Williamson und Gulick, 1942). Das Interesse wandte sich jedoch vor allem den im Elektrolythaushalt des Körpers besonders wichtigen Natrium- und Kaliumionen zu (Itoh und Schwartz, 1957). Es konnte im Kern eine um das Mehrfache höhere Natriumkonzentration als im Cytoplasma nachgewiesen werden (Langendorf et al., 1961), wobei aktiver Na^+ -Transport an der Kern-Plasma-Grenzschicht weitgehend ausgeschlossen wurde (Siebert, Langendorf und Hannover, 1965). Es wurde vielmehr wahrscheinlich gemacht, daß bezüglich der Elektrolyte eine direkte Kommunikation zwischen Kern und Extrazellulärflüssigkeit besteht. Diese Vermutung wurde auch durch eine Kinetik der Natriumaufnahme in den Kern (Langendorf und Siebert, 1964) und durch die Messung einer hohen Chloridkonzentration im Kern (Langendorf et al., 1966) gestützt, ebenso durch die Tatsache der schnellen Rubidiumaufnahme aus der Extrazellulärflüssigkeit in den Kern (Zörlein et al., 1969).^{x)}

{) Verschiedene Anwendungsgebiete

Einige unter den oben genannten Gesichtspunkten nur schwer einzuordnende Veröffentlichungen sollen hier nur kurze Erwähnung finden. So diente die nichtwässrige Technik zum Nachweis einer Globulinfraktion in Thymus- und Leberzellkernen des Kalbes (Kirkham und Thomas, 1953), zu Studien über DNA-Gehalt

x) Überblicke über dieses Gebiet finden sich bei Siebert, 1969 und 1972

und in-vitro-Inkorporierung von ^{32}P in Zellkernen (Kay et al., 1956) und zur Sicherung einer Hämoglobinsynthese in Kernen aus Vogelerythrocyten (Hammel und Bessmann, 1964). In der letztgenannten Veröffentlichung wurden erstmals elektronenmikroskopische Aufnahmen nichtwässrig gewonnener Zellorganellen gezeigt.

Als neuer Anwendungsbereich gelang die Isolation von Nucleolen aus homogenisierten Rattenleberzellkernen durch Zonenzentrifugation in nichtwässrigen Medien (Shakoori, Schlatterer und Siebert, 1972; Shakoori et al., 1972). Die Autoren konnten unter anderem eine gegen den Gesamtkern stark erhöhte NMN-Adenyltransferase-Aktivität sowie eine erniedrigte LDH-Aktivität im Nucleolus nachweisen.

2. Isolierung von Chloroplasten

a) Erste Anwendungen der Methode auf Chloroplasten

Nach dem Kern war das nächste Zellorganell, auf welches die nichtwässrige Technik Anwendung fand, der Chloroplast. Fast gleichzeitig wurden drei ganz ähnliche Methoden zur Chloroplastenisolierung angegeben (Heber, 1957; Behrens und Thalacker, 1957; Stocking, 1959). Die Technik war eine ganz ähnliche wie bei der Zellkernpräparation und beinhaltete das Tiefgefrieren von Pflanzenzellen, Homogenisation und Dichtegradienten- oder Differentialzentrifugation in Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther-Gemischen. Es zeigte sich, daß aus stärkefreien, also für einige Zeit vom Licht ferngehaltenen Pflanzen, besonders reine Präparationen zu gewinnen waren (Thalacker und Behrens, 1959).

Der Ermittlung des Chloroplastenanteils am Gesamtprotein der Zelle (Heber, 1960) folgte die Angabe zur Errechnung der Reinheit von Chloroplastenfraktionen auf Grund von Leit-enzymen (Heber, 1960).

b) Untersuchung von Enzymen in Chloroplasten

Bei der üblichen wässrigen Chloroplastenisolation muß mit einem ganz erheblichen Auswaschen von in vivo in Chloroplasten lokalisierten Enzymen gerechnet werden (Heber, 1960). Mit Hilfe der nichtwässrigen Technik konnten erstmalig sichere Angaben über "Leitenzyme", d.h. innerhalb oder außerhalb der Chloroplasten lokalisierte Enzyme gemacht werden (Heber, 1960).

Die folgenden Arbeiten auf diesem Gebiet traten naturgemäß in den Dienst der Photosyntheseforschung. Untersucht wurden vor allem zuckersynthetisierende Enzyme (Bird, Porter und Stocking, 1965; Heber, Hallier und Hudson, 1967), daneben Enzyme des Aminosäurenstoffwechsels (Santarius und Stocking, 1969).

c) Untersuchung von Substraten in Chloroplasten

Unter den Substraten, deren Verteilung in der Pflanzenzelle unter Verwendung der unpolaren Präparation untersucht wurde, standen die frühen Produkte der Photosynthese im Vordergrund (Stocking, Williams und Ongun, 1963; Ongun und Stocking, 1965). Durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung bei verschiedenen langen Belichtungszeiten konnten Kinetiken der Synthese und des Transports von Zuckern aufgestellt werden (Heber und Willenbrink 1963, 1964).

Dem folgten Arbeiten über den Einbau von ^{14}C und ^{32}P in die bei der Photosynthese intermediär auftretenden Phosphatester (Heber et al., 1964; Urbach et al., 1965; Heber et al., 1967).

Die der CO_2 -Fixierung entsprechende Photosyntheseleistung, die Photophosphorylierung, wurde durch Bestimmung der Phosphatverteilung bei Licht und Dunkel (Ullrich et al., 1965), der Konzentrationsänderungen von Phosphat und Adeninnucleotiden bei Belichtung (Santarius und Heber, 1965; Heber und Santarius, 1970) und der Adeninnucleotid-Phosphat-Verteilung in der Pflanzenzelle verfolgt (Santarius et al., 1964).

In Ergänzung hierzu wurden auch die Verteilung der Pyridinnucleotide und ihre lichtabhängigen Konzentrationsänderungen untersucht (Heber und Santarius, 1965). Es fand sich eine strenge Trennung zwischen Cytoplasma und Chloroplasten.

Erwähnt werden soll noch eine methodisch besonders interessante Arbeit. In einer "Kreuzung" zwischen in-vivo- und in-vitro-Methode wurde die CO_2 -Fixation an wässrig isolierten Chloroplasten gemessen, deren Enzymmuster durch einen Extrakt aus nichtwässrig isolierten vervollständigt worden war (Heber und Tyszkiewicz, 1962).

Eine Zusammenfassung über wichtige Ergebnisse auf den hier nur kurz angesprochenen Gebieten findet sich in (39).

3. Isolierung von Mitochondrien

Bisher wurde nur einmal eine Methode beschrieben, auf nichtwässrigem Wege Mitochondrien zu isolieren (Cerkasow und Foustka, 1966). Die Autoren machen detaillierte Angaben über die Gewinnung von Mitochondrien aus Flugmuskeln von Heuschrecken. Die Methode beinhaltet entsprechend der Anwendung auf andere Zellorganellen Frierstop, Lyophilisation, Homogenisierung und Dichtegradientenzentrifugation in Gemischen von Petroläther und Freon 113. Auf diese Weise konnten Mitochondrien stark angereichert werden. Die Präparationen wurden mit Hilfe von Leitenzymen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert.

Diese Arbeit stand am Beginn unserer Experimente.

METHODISCHE ARBEITEN UND ERGEBNISSE

Überlegungen am Ausgangspunkt der experimentellen Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, eine Methode zur nichtwässrigen Isolation von Mitochondrien aus Rattenleber zu finden. Die dazu notwendige Prozedur zerfällt ihrer Natur nach in bestimmte grundlegende Schritte. Die endgültig erhaltene Mitochondrienpräparation hat ebenso wie jede Vorstufe gewisse Voraussetzungen zu erfüllen. Diese Voraussetzungen sollen hier, am Anfang des Abschnittes, aufgezählt werden. Im Folgenden muß jeder einzelne dieser Punkte bewiesen werden. Die Voraussetzungen sind:

- a) Der metabolische Zustand der Zelle in vivo muß gleichsam aus dem Laufe schlagartig angehalten werden. Die Bedingungen dafür sind für unseren speziellen Fall, die Rattenleber, bereits von anderen Autoren beschrieben worden und werden daher unter dem Abschnitt "Methoden" behandelt.
- b) Der solchermaßen fixierte Stoffwechselzustand darf während der Präparation keine Veränderung erfahren.
- c) Aus dem Gewebe muß das Wasser vollständig entzogen werden.
- d) Das Wiedereindringen von Wasser muß verhindert werden.
- e) Das Material muß hinreichend homogenisiert werden.
- f) Die Leberzelle muß in eine Mitochondrien- und in eine Cytoplasmafraktion aufgeteilt werden, damit Messungen in beiden Kompartimenten vergleichend gegenübergestellt werden können.

Die unter b) genannte Voraussetzung kann noch unterteilt werden: Zum einen soll die physikalische Schädigung

möglichst gering sein. Dies betrifft vor allem die gegen physikalische Denaturierung empfindlichen Enzyme; insbesondere müssen zur Identifizierung der Fraktionen bestimmte Leitenzyme meßbar sein. Zum anderen dürfen keine chemischen Reaktionen ablaufen. Dies betrifft die Substrate, und unter diesen vor allem die energiereichen.

Es sollen nicht bei allen beschriebenen Schritten der Prozedur sämtliche erwähnten Gesichtspunkte kontrolliert werden. Vielmehr soll jeder Schritt daraufhin untersucht werden, welche der Voraussetzungen er gefährdet. In einer Qualitätskontrolle am Ende jedes Abschnitts soll dann die Erfüllung der jeweiligen Bedingung gezeigt werden.

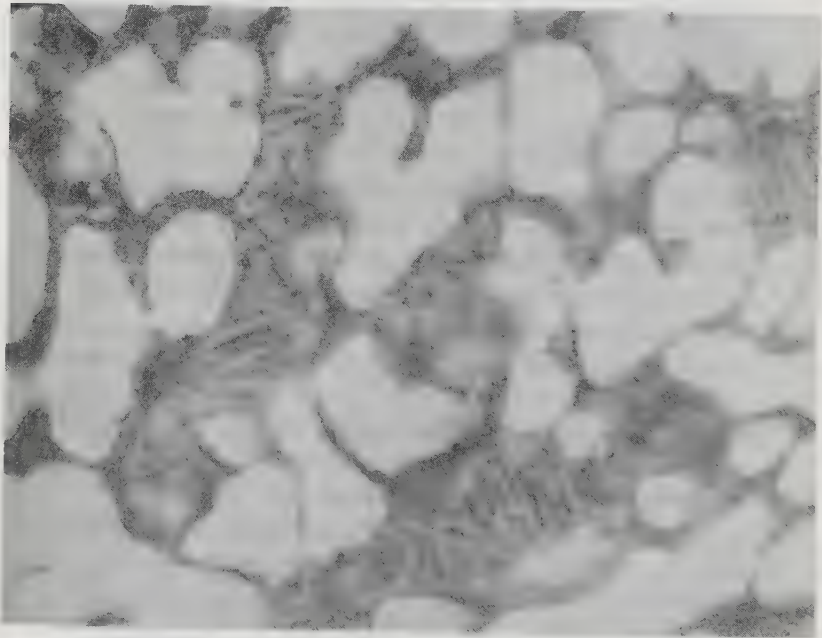
1. Gefriertrocknung

Das Ausgangsmaterial für unsere eigenen methodischen Arbeiten bildete das bei Temperatur des flüssigen Stickstoffs tiefgefrorene und pulverisierte Rattenleberpulver. Der Weg bis zu diesem Punkt wird bei den Methoden beschrieben. Das Pulver wurde noch im Kryostaten gewogen und davon ein Aliquot zur Substrat-
testung abgezweigt. Dann wurde es in ein Becherglas aufgenommen und unter Luftabschluß - um das Eindringen von Kondenswasser zu vermeiden - im Kühlbad eines Lyophilisators vom Typ Kniese auf eine Temperatur von -60°C gebracht. Das Becherglas wurde nun geöffnet und in den Lyophilisator eingebracht. Das Gefriertrocknen nahm 48 Stunden in Anspruch. Dabei stellt sich ein Druck von 2 bis $3 \text{ mal } 10^{-3}$ Torr ein, welcher dem Dampfdruck von Wasser bei -60°C entspricht. Nach Abschluß der Lyophilisation wurde die Apparatur vorsichtig belüftet, um Substanzverlust durch Herausblasen des sehr leichten getrockneten Pulvers zu vermeiden. Eine Wasser-

aufnahme aus der Luft durch das hygroskopische Lyophilisat wurde mittels eines Calciumchloridrohres verhindert, das dem Belüftungsventil vorgeschaltet war. Das herausgenommene Becherglas wurde sogleich verschlossen. Das so erhaltene Material wurde bis zum Gebrauch bei -20°C in einem Exsikkator über P_2O_5 aufbewahrt.

Qualitätskontrolle.

a) Morphologie des getrockneten Gewebes



Maßstab 1 : 57 000

Abb. 1 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von gefriergetrocknetem Lebergewebe. Die Fixierung erfolgte unter Abwesenheit von Wasser mit in Heptan gelöstem Osmiumtetroxyd.

Die so erhaltenen elektronenmikroskopischen Bilder sind nicht so scharf wie die von Geweben, welche mit konventionellen Methoden fixiert sind. Dennoch ist die Feinstruktur der Zelle gut erkennbar. In dem Bild ist zu unterscheiden, daß das lyophilisierte Gewebe die Gestalt eines Schwammes hat mit großräumigen Löchern, die durch das Verdunsten des Zellwassers gebildet werden. Die solidere Substanz aus Mitochondrien und Kernen wird durch Brücken von endoplasmatischem Retikulum und präzipitiertem Protein aus dem Zytosol verbunden.

b) Spiegel der Adeninnucleotide vor und nach Lyophilisierung.

Da das Gewebe zumindest zu Beginn der Lyophilisierung noch Wasser enthält, war vor allem nachzuweisen, daß während dieses Schrittes keine chemischen Reaktionen ablaufen können, die zu nachträglichen Veränderungen der Metabolite führen. Besonders interessierte uns dabei, ob es während der Aufarbeitung zu einem Zerfall des ATP kommt. Zu diesem Zweck wurden die energiereichen Substrate ATP, ADP und AMP sowohl in einem vor der Lyophilisierung abgezweigten Aliquot des gefrorenen Lebergewebes als auch in einem Teil des getrockneten Pulvers bestimmt. Der Wasserentzug bei Gefrieretrocknung ergab sich aus der Gewichts Differenz des Materials vor und nach Lyophilisation. Die in dem gefrieretrockneten Material gemessenen Metabolitmengen wurden entsprechend dem Wasserverlust auf die Gewichtseinheit Frischleber umgerechnet.

Tabelle 1 zeigt ein typisches Experiment dieser Art.

Tab. 1

Stabilität der Adeninnucleotide in Lebergewebe
während der Gefriertrocknung

In diesem Experiment wurde für die Gefriertrocknung ein Wasserverlust von 78% des Frischgewichtes ermittelt und für die Berechnung nach der Gefriertrocknung verwendet.

	ATP	ADP	AMP	Σ AdN	ATP/ADP
μ Mole/g Frischgewicht					
vor Gefrier- trocknung	2,50	0,58	0,12	3,20	4,4
nach Gefrier- trocknung	2,52	0,57	0,12	3,21	4,5

Es zeigt sich, daß die Adeninnucleotide bei Lyophilisierung in unveränderter Menge erhalten bleiben.

Da dies für die energiereichen und damit besonders instabilen Adeninnucleotide bewiesen ist, kann auch von den übrigen Metaboliten angenommen werden, daß sie während des Gefriertrocknens keine Veränderung erfahren.

c) Wasserentzug bei Gefriertrocknung

In einem weiteren Experiment wurde zur Kontrolle des vollständigen Wasserentzuges parallel zur Lyophilisierung ein Aliquot perfundierten Lebergewebes entnommen und 24 Stunden lang im Wärmeschrank bei 60°C über Kaliumhydroxyd getrocknet. Der Wasserentzug wurde bei beiden Methoden aus dem Gewichtsverlust errechnet:

Wasserentzug durch Wärmetrocknen: 84%

Wasserentzug durch Gefriertrocknen: 85%

In verschiedenen Experimenten variierte der Wasserentzug zwischen 78% und 84%. Die Erklärung dafür ergibt sich aus der etwas unterschiedlichen Durchströmung mit Flüssigkeit bei der Leberperfusion, die sich trotz stets gleichbleibender Perfusionsgeschwindigkeit nicht vollständig normieren ließ.

2. Auswahl und Präparation der unpolaren Medien

Die verschiedenen subzellulären Partikel sind bei unserer Technik nur auf Grund ihres Dichteunterschiedes voneinander zu trennen. Es war also nötig, ein bezüglich der Dichte variables unpolares Medium zu wählen, das sich insbesondere zur Schichtung eines Dichtegradienten eignen würde. Wie in den vorausgegangenen Arbeiten wurden dafür wechselnde Mischungen eines spezifisch leichten und eines spezifisch schweren organischen, unpolaren Lösungsmittels gewählt.

Als leichtes Medium diente n-Heptan. Als schweres wurde zunächst Freon 113 verwendet (Cerkasow, 1966). Die späteren Experimente

wurden mit Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt (Behrens, 1932), da sich gezeigt hatte, daß dieses ebenso geeignet war. Die Lösungsmittel wurden mit Calciumchlorid von Wasser befreit und über der gleichen Substanz bei 4°C aufbewahrt.

3. Homogenisation

a) Vorversuche

Es zeigte sich, daß die Homogenisation des gefriergetrockneten Materials extrem schwierig ist. Zunächst wurde unter elektronenmikroskopischer Kontrolle die Zerkleinerung in einem Porzellanpotter versucht. Als dies vollkommen erfolglos blieb, wurde das Material bei Eiskühlung in einem engen Glasschliffpotter gerieben, zuletzt insgesamt zwei Stunden lang. Unter diesen Bedingungen ist elektronenmikroskopisch eine gewisse Zertrümmerung des Gewebes sichtbar. Ferner zeigte sich in einer vorläufigen Methode der Auftrennung (s.u.) eine deutliche Tendenz zur Anreicherung von Mitochondrien einerseits und Zellkernen andererseits. Dennoch blieb die Homogenisierung im Schliffpotter auch wegen der unvermeidlichen Enzymschädigung (s.u.) unbefriedigend.

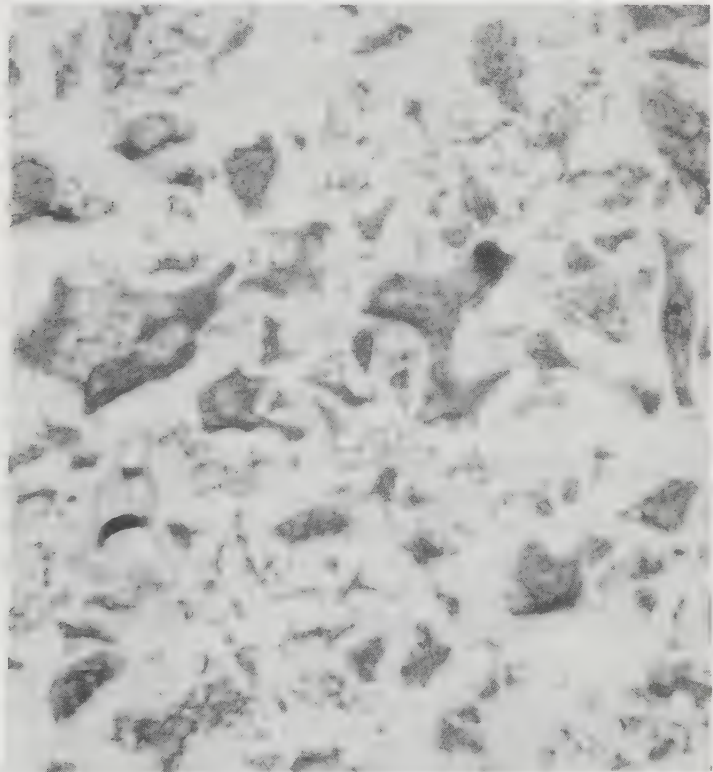
b) Endgültige Methode

Die endgültige Homogenisierungstechnik war folgende:

Es wurde durch Mischen von 36 Teilen n-Heptan und 64 Teilen Tetrachlorkohlenstoff ein Medium der Dichte $d=1,25$ (Temperatur=0°C) vorbereitet. Zu 10 ml dieser Flüssigkeit wurden 0,25 g des

getrockneten Lebergewebes hinzugefügt. Das entstandene Gemisch wurde insgesamt 40 Minuten lang in einem Bühler-Homogenisator (Firma Bühler, Tübingen; es handelt sich um ein System mit rotierendem Messer) homogenisiert. Dabei wurde die Maschine alle zwei Minuten abgeschaltet, um lokale Überhitzung zu vermeiden und ein gleichmäßiges Durchkühlen des Systems zu erreichen. Die Kühlung erfolgte durch ein Eisbad.

Qualitätskontrolle.



Maßstab 1 : 21 000

Abb. 2 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von homogenisiertem Lebergewebe.

Es ist zu erkennen, daß der "Schwamm" des lyophilisierten Gewebes zerbrochen ist. Neben Mitochondrien mit deutlich unterscheidbaren Cristae sieht man kleinere Fragmente, welche Teile von endoplasmatischem Retikulum und Zytoplasma enthalten. Offenbar sind die Mitochondrien nicht vollständig rein, sondern es haften ihnen Reste von Retikulum und Zytoplasma an. Ein Teil der Mitochondrien ist in Stücke zerschnitten. Hieraus ersieht man, daß man nicht erwarten kann, reine Mitochondrien zu isolieren. Dennoch erscheint es möglich, Fraktionen mit verschiedenen Anteilen an mitochondrialem und extramitochondrialem Material zu gewinnen.

Vollständige Zellkerne sind nirgends zu erkennen.

b) Enzymaktivitäten vor und nach Homogenisierung

Es kann vorausgesetzt werden, daß polare Substanzen in unpolaren Medien ungelöst bleiben und entsprechend keine Veränderung erfahren können. Da die Homogenisierung in vollständig wasserfreiem Medium durchgeführt wird, sind entsprechend chemische Reaktionen der Metabolite, bei denen es sich ja um polare Substanzen handelt, nicht zu erwarten. Die Metabolitspiegel bleiben also während der Homogenisierung unverändert.

Im Gegensatz dazu muß eine physikalische Schädigung der empfindlichen Proteine durch Wärmeeinwirkung in Betracht gezogen werden. Bei den mechanischen Vorgängen der Homogenisierung muß mit Wärmeentwicklung vor allem

durch Reibung und mit lokalem Wärmestau gerechnet werden.

Es war demnach zu befürchten, daß Enzyme an Aktivität verlieren würden. Durch einen unterschiedlichen Aktivitätsverlust der gewählten Leitenzyme würde nach der Auftrennung eine Zellfraktionierung vorgetäuscht, die in Wirklichkeit nicht stattgefunden hätte. Es war also zu beweisen, daß während der Homogenisation die Enzymaktivität unabhängig von der Homogenisationsdauer konstant bleibt. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

α) Enzymaktivitäten bei Schliffpotterhomogenisierung

Folgende Enzyme wurden getestet (s.Methoden):

Glutamatdehydrogenase GluDH

als Leitenzym für Mitochondrien

Phosphoglyceratkinase PGK

als Leitenzym für Cytoplasma

Lactatdehydrogenase LDH

als Leitenzym für Cytoplasma

NADPH-Cytochrom c - Reduktase NADPH-Cyt c-Red

als Leitenzym für endoplasmatisches
Retikulum

NMN-Adenyltransferase NMN-Ad-Tr

als Leitenzym für den Zellkern

Die Enzyme wurden nach drei Minuten und nach 90 Minuten Homogenisationsdauer im Schliffpotter bei Eiskühlung getestet und ihre spezifische Aktivität bestimmt.

Tabelle 2 zeigt die spezifischen Aktivitäten nach 3 Minuten und 90 Minuten Homogenisieren.

Tab. 2

Enzymaktivitäten bei Schliffpotterhomogenisierung

	GluDH	PGK	LDH	NADPH- Cyt c-Red	NMN- Ad-Tr
Spez. Aktivität in willkürlichen Einheiten					
nach 3 Min.	100	100	100	100	100
nach 90 Min.	76	76	82	84	103

Es zeigt sich, daß die Aktivität während der Homogenisierung erheblich abfällt. Lediglich die NMN-Adenyltransferase zeigt eine erstaunliche Stabilität gegen die Homogenisierung. Dagegen ist gerade die GluDH sehr empfindlich und erleidet unter den gewählten Bedingungen starke Aktivitätsabfälle.

Die Schlußfolgerung aus diesem Experiment ist, daß die Schliffpotterhomogenisation keine geeignete Methode für unsere Zwecke darstellt.

B) Enzymaktivitäten bei Bühler-Homogenisierung

Während eines Homogenisierungsganges (Bedingungen s.o.) wurden nach 5, 10 und 20 Minuten (20 Minuten entsprechen etwa 1 1/2 Stunden Schliffpotterhomogenisierung) Proben entnommen. Nach entsprechender Vorbereitung (s.Methoden) wurden die spezifischen Aktivitäten der Lactatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase, des empfindlichsten Enzyms, bestimmt.

Tab. 3

Enzymaktivitäten bei Bühler-Homogenisierung

	LDH	GlDH
Spez.Aktivität in willkürlichen Einheiten		
nach 5 Min.	100	100
nach 10 Min.	94	104
nach 20 Min.	99	102

Es wird deutlich, daß die Aktivitäten konstant bleiben. Die Homogenisierung im Bühler - Apparat stellt demnach eine für unsere Zwecke gut geeignete Methode dar.

4. Fraktionierung

Das nunmehr homogenisierte Material war im nächsten Schritt in Fraktionen subzellulärer Partikel aufzutrennen. Die Kontrolle erfolgte wiederum morphologisch und durch Bestimmung der im letzten Abschnitt genannten Leitenzyme.

Es sollen zwei Methoden beschrieben werden:

- a) Eine vorläufige Auftrennung durch eine Art der Differentialzentrifugation, die vor allem zur Kontrolle der Homogenisierung diente und nicht voll befriedigen konnte.
- b) Eine Fraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation.

a) Differentialzentrifugation.

Das Homogenat wurde in 10 ml eines Mediums der Dichte $d = 1,30$ (0°C) suspendiert und 20 Minuten zentrifugiert^{x)} bei 10 000 rpm (zwischen 5000 und 16 000 g)

Nach der Zentrifugation war das Homogenat in eine am Boden des Zentrifugenbeckers sedimentierte und eine an der Flüssigkeitsoberfläche schwimmende Fraktion aufgeteilt. Die beiden Fraktionen wurden durch Absaugen mit einer Pipette voneinander getrennt. Beide Hälften wurden mit 5 ml eines Mediums der Dichte $d = 1,27$ (0°C) aufgefüllt. Zur Entfernung von bei der Sedimentierung möglicherweise entstandenen Konglomeraten

^{x)} Wenn nicht eigens erwähnt, wurde zur Zentrifugation stets der Swing-out-Rotor Hb 4 einer Sorvall-Zentrifuge RC 2 b verwendet. Während der Zentrifugation wurde eine Temperatur von 4°C aufrechterhalten.

wurde nochmals kurz homogenisiert. Dann wurde die oben beschriebene Zentrifugation und Fraktionierung wiederholt, so daß endlich vier Fraktionen entstanden (Fig. 1)

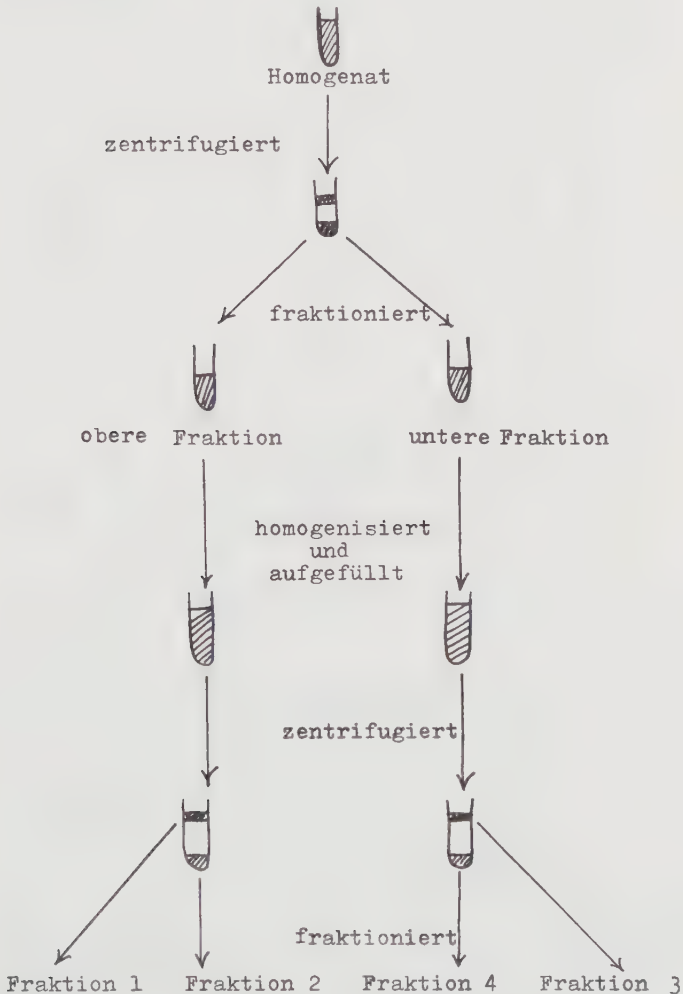


Fig. 1 : Schema der nichtwässrigen Fraktionierung durch Differentialzentrifugation

In jeder dieser vier Fraktionen wurden die Enzyme Glutamatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase und NMN-Adenyltransferase getestet. Durch Bilden eines Quotienten aus der spezifischen Aktivität eines Enzyms in einer bestimmten Fraktion und der durchschnittlichen spezifischen Aktivität des gleichen Enzyms in allen vier Fraktionen wurden Anreicherungsfaktoren errechnet (Fig. 2).

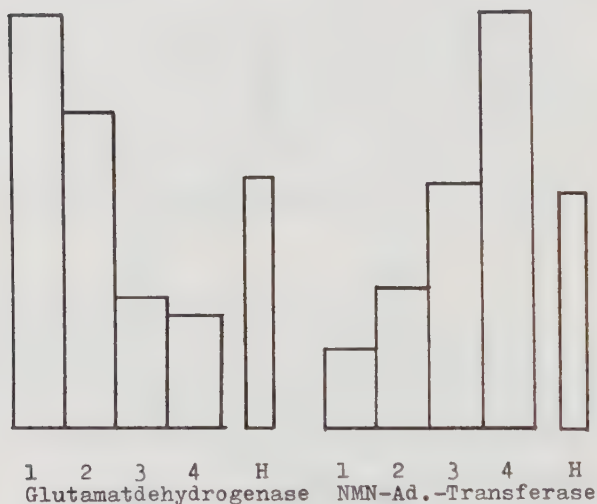


Fig. 2 : Verteilung der Leitenzyme in den Fraktionen 1 - 4 nach Differentialzentrifugation von homogenisiertem Rattenlebergewebe.

Die mit "H" markierte Säule stellt die spezifische Aktivität des Enzyms im unfractionierten Homogenat dar. Willkürliche Einheiten.

Wie ersichtlich, konnten mit dieser einfachen Methode Mitochondrien in der obersten und Zellkerne in der untersten der Fraktionen auf jeweils knapp das Doppelte ihres normalen Gehaltes in der Zelle angereichert

werden. Da eine bessere Trennung der Zellorganellen mit dieser Methode nicht möglich war, konnte dieser Weg nicht befriedigen.

b) Dichtegradientenzentrifugation

a) Schichtung des Gradienten

Durch kontinuierliche Verdünnung eines Mediums von der Dichte $d = 1,30$ (0°C) durch ein Medium der Dichte $d = 1,27$ (0°C) in einem System von zwei kommunizierenden Röhren (s. Abb. 3) wurde ein linearer Dichtegradient von $d = 1,30$ bis $d = 1,27$ in einen Zentrifugenbecher aus Polyäthylen von 10 ml Inhalt geschichtet.

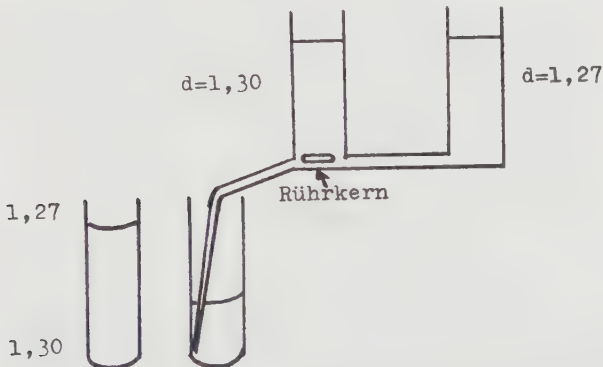


Abb. 3 : Zur Schichtung des Dichtegradienten verwendetes System

B) Beschickung mit Homogenat

Mit einer Pipette wurden 2 ml Homogenat vorsichtig über den fertigen Gradienten gelagert. Sodann wurde durch vorsichtiges Rühren mit einem dünnen Glasstab an der Grenzfläche zwischen dem Gradienten und der Homogenatsuspension eine leichte Durchmischung erzielt. Dadurch wurden Dichtesprünge vermieden,

welche die Verteilung des Zellmaterials während der Zentrifugation beeinträchtigt hätten.

γ) Zentrifugation und Fraktionierung

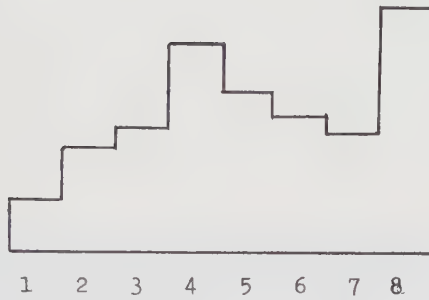
Der beschichtete Gradient wurde 75 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert. Der Zentrifugenbecher wurde nach langsamem Auslaufen des Rotors vorsichtig herausgehoben. In den ersten Experimenten wurde der Inhalt durch Abheben mit einer Eppendorf-Pipette von oben her in 8 gleichgroße Fraktionen unterteilt. In späteren Experimenten wurde folgendermaßen verfahren: Der Becher wurde fixiert und von oben her vorsichtig eine dünne Kanüle bis auf den Boden eingeführt. Durch diese Kanüle wurde Tetrachlor-kohlenstoff eingeleitet. Durch die spezifisch schwerere Flüssigkeit wurde der gesamte Gradient angehoben. Von der Oberfläche wurde das Material abgesaugt und über einen automatischen Fraktions-teiler in gleichgroße Portionen getrennt.

Qualitätskontrolle:

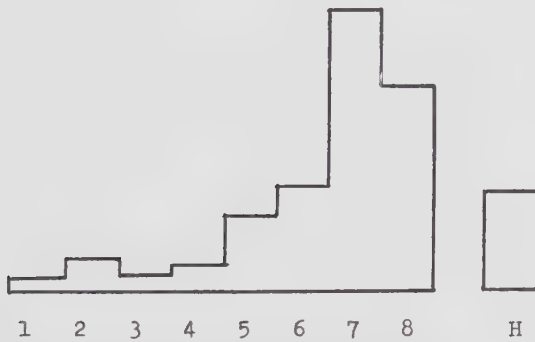
Verteilung der Zellorganellen.

Fig. 3 zeigt die Verteilung des Proteins sowie der Leitenzyme GluDH, PGK und NMN-Adenyltransferase in einem typischen Experiment. Aufgetragen sind die Anreicherungsfaktoren der Enzyme gegen die Fraktionen des Dichtegradienten mit steigendem spezifischen Gewicht.

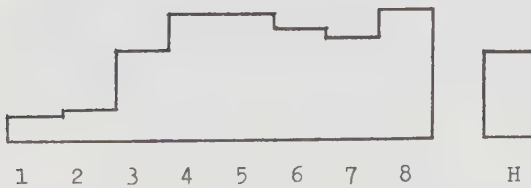
Fig. 3



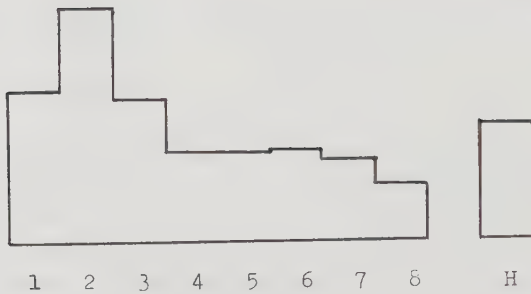
Proteinverteilung



Verteilung der NMN-Adenylyltransferase



Verteilung der Phosphoglyceratkinase



Verteilung der Glutamatdehydrogenase

Fig. 3 : Anreicherungs faktoren der Enzyme Glutamatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase und NMN-Adenyltransferase, berechnet als Quotient aus der spezifischen Aktivität des Enzyms in der jeweiligen Fraktion und der spezifischen Aktivität im unfraktionierten Homogenat. Auf der Abszisse die Nummern der Fraktionen von 1 - 8 , wobei Fraktion 1 die niedrigste, Fraktion 8 die höchste Dichte im Gradienten hat. "H" bezeichnet den Quotienten aus der durchschnittlichen spezifischen Aktivität in allen Fraktionen und der spezifischen Aktivität im Homogenat.

Es wird sichtbar, daß die Glutamatdehydrogenase in den obersten Fraktionen stark angereichert ist als Zeichen für eine Häufung von Mitochondrien in diesem Bezirk des Gradienten. Diese Tatsache stimmt gut überein mit den morphologischen Untersuchungen.

Abb. 4 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Probe aus dem obersten Bereich des Gradienten. Die freien Mitochondrien bzw. Mitochondrienbruchstücke mit Membran und Cristae sowie mit relativ spärlichen Anhängen von Cytosol und endoplasmatischem Retikulum sind gut erkennbar.

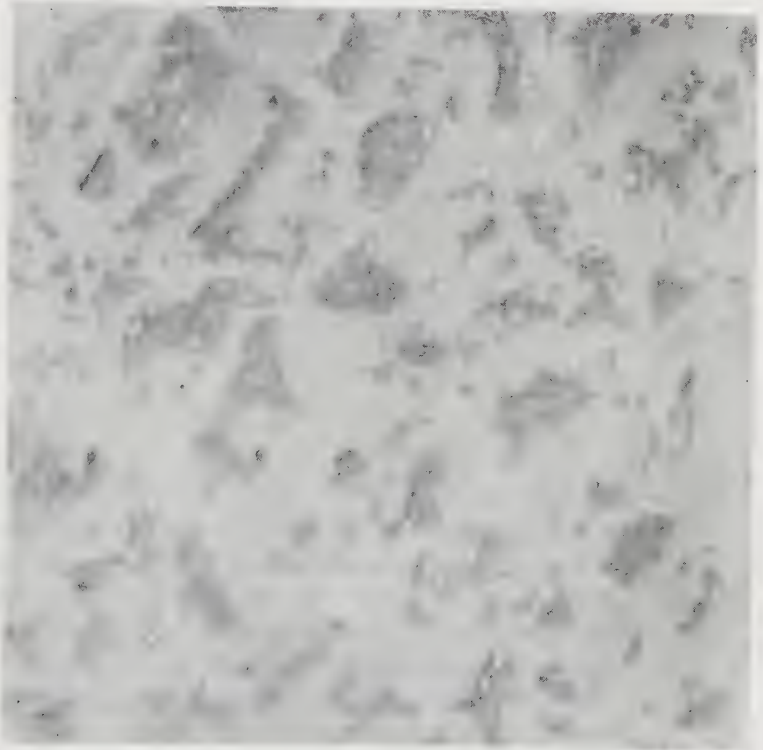


Abb. 4 : Elektronenmikroskopische Aufnahme im
Maßstab 1:21 000
Material aus dem spezifisch leichtesten
Teil des Dichtegradienten.

Die Zellkerne finden sich vorwiegend in den schwersten Fraktionen. Die Morphologie läßt hier keinen Schluß zu. Ganze Zellkerne sind auch nach vergleichsweise milder Homogenisation nie sichtbar, sondern nur relativ kleine strukturarmer Stücke. Entsprechend sind auch in keiner Fraktion des Dichtegradienten ganze Kerne zu finden, auch nicht in Fraktionen mit hoher Anreicherung von NMN-Adenyltransferase. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß die Zellkerne bei der Homogenisation zertrümmert werden.

Die PGK als Indikator für das Zytosol ist in den oberen mitochondrienreichen Fraktionen verdrängt. In den mittleren und unteren Fraktionen bleibt sie auf etwa gleicher Höhe. Dies stimmt gut überein mit der Tatsache, daß die glykolytischen Enzyme im Kern in etwa gleicher Aktivität vorliegen wie im Zytoplasma.

Aus früheren Untersuchungen (Schollmeyer und Klingenberg, 1962; Long, 1961) ist bekannt, daß 36% des Proteins in der Rattenleber mitochondrial, 64% extramitochondrial ist. 17% des Proteins ist im Zellkern enthalten (Hogeboom und Schneider, 1952; Siebert et al., 1965, Shakoori et al., 1972). Multipliziert man diese Prozentzahlen mit den Anreicherungsfaktoren der entsprechenden Enzyme in jeder Fraktion, so ergibt sich der prozentuale Anteil des Zellorganells an dem Protein in der betrachteten Fraktion. Die Summe aus den Anteilen von mitochondrialem und extramitochondrialem Protein muß in jeder Fraktion 100% ergeben, vorausgesetzt, es ist nur Rattenleberparenchym bzw. dessen Reste in der Fraktion enthalten.

Durch die Trennung wird ja lediglich das natürliche numerische Verhältnis der Zellorganellen verschoben.

Fig. 4 a zeigt diese Kalkulation graphisch aufgetragen.

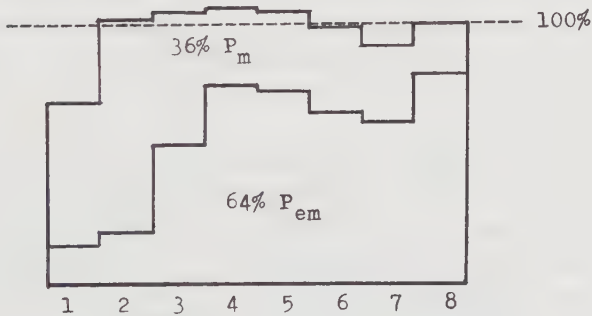


Fig. 4 a : Verteilung subzellulärer Partikel in den Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation von Rattenlebergewebe, berechnet aus den Anreicherungs-faktoren der Leitenzyme.

a) P_m = mitochondriales Protein.

Leitenzym Glutamatdehydrogenase

P_{em} = extramitochondriales Protein.

Leitenzym Phosphoglyceratkinase

b) P_{Z+ER} = Protein des Zytoplasmas und des endo-plasmatischen Retikulums. Leitenzym

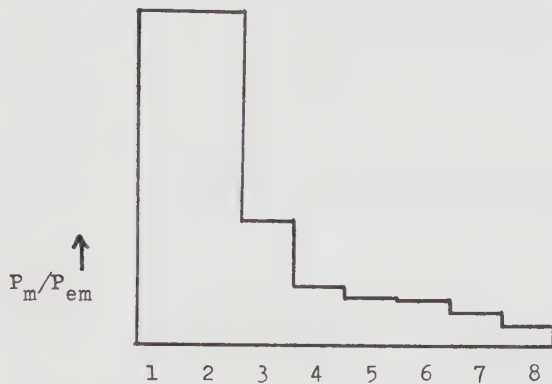
NADPH-Cytochrom c - Reduktase

P_K = Protein des Kerns.

Leitenzym NMN-Adenyltransferase

Fig. 4 b auf der nächsten Seite

In Fig. 5 schließlich wird das Verhältnis von mitochondrialem zu extramitochondrialem Protein dargestellt. Es zeigt sich, daß die Mitochondrien kontinuierlich in den oberen Fraktionen des Gradienten angereichert werden.



DISKUSSION

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die Entwicklung einer Methode. Aus diesem Grund erscheint es angemessen, in der Diskussion die einzelnen Schritte der Prozedur nochmals durchzugehen. Dabei soll auch auf zu vermeidende Fehlerquellen bei der Durchführung hingewiesen werden.

1. Gefrierstop

Die Bedingungen für einen wirkungsvollen Gefrierstop und eine geeignete Lyophilisation sind bereits genau untersucht worden (Wollenberger, Krause und Wahler, 1958; Hohorst, Kreutz und Bücher, 1959; Grunst, 1968). Wichtige Gesichtspunkte finden ferner in dem entsprechenden Kapitel der Arbeit von Cerkasow Erwähnung. Es sollen hier deshalb nur noch einige Punkte hervorgehoben werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Fraktionen subzellulärer Partikel zu präparieren, die eine Substratmessung erlauben. Dabei sollen die Substrate in den Fraktionen in gleicher Menge vorliegen wie im Gleichgewichtszustand der lebenden Zelle. Alle Lebensvorgänge in der Zelle bzw. in dem ganzen Organ müssen deshalb gleichsam zu einer Momentaufnahme schlagartig angehalten werden. Das ist die Aufgabe des Gefrierstops. Durch schnelles Einfrieren des gesamten Organs wird das freie Wasser gebunden und damit weiteren Stoffwechselvorgängen der Raum entzogen.

Wirkt auf ein Organ von außen eine sehr tiefe Temperatur ein, so werden zunächst die oberflächlichen Schichten, welche dieser Tem-

peratur unmittelbar ausgesetzt sind, gefrieren. Die Geschwindigkeit des Einfrierens ist dabei abhängig von der pro Zeiteinheit entzogenen Wärmemenge, also einerseits von der Temperaturdifferenz, andererseits von der Wärmeleitfähigkeit der hüllenden Substanz. Man muß also versuchen, mit möglichst tiefer Temperatur zu kühlen und hierzu einen Stoff mit guter Wärmeleitfähigkeit verwenden. Insbesondere muß bei der Kühlung mit flüssigem Stickstoff eine Vorrichtung gewählt werden, bei der ein Leydenfrostsches Phänomen vermieden wird. Dies wurde bei uns erreicht, indem nicht direkt mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, sondern mit Metallblöcken, die vorher in flüssigen Stickstoff getaucht waren.

Die tiefer gelegenen Schichten des Organs kommen beim Gefrierstop nicht mehr in direkte Berührung mit den gekühlten Metallteilen. Ihnen wird die Wärme durch Leitung über die oberflächlichen, bereits gefrorenen Schichten entzogen. Da nun die Wärmeleitfähigkeit von Wasser und von Eis wesentlich geringer ist als die von Metall, werden die tieferen Schichten langsamer gefrieren, und zwar um so langsamer, je tiefer sie gelegen sind. Bei dem dadurch verlangsamten Einfrieren der tiefen Schichten verliert der Frierstop seinen Sinn, denn einerseits sind die tiefgelegenen Organstrukturen von der Flüssigkeits- und damit Sauerstoffzufuhr durch die gefrorenen oberflächlichen abgeschnitten, andererseits können bei Anwesenheit von freiem Wasser weiter Stoffwechselvorgänge ablaufen, welche alsbald katabolen Charakter annehmen müssen.

Die Organteile müssen beim Einfrieren also möglichst dünn sein. Nach vorausgegangenen Untersuchungen (Grunst, 1968) darf kein Gewebsteil mehr als 1 mm von der kühlenden Metalloberfläche entfernt sein. Eine Zerkleinerung des Organs vor dem Gefrierstop verbietet sich, da sonst die Perfusion und damit die Sauerstoffversorgung unmöglich wird. Praktisch wird deshalb so vorgegangen (Wollenberger, Krause und Wahler, 1958, Hohorst, Kreutz und Bücher, 1959), daß Einfrieren und Zerkleinerung gleichzeitig geschieht, indem das Organ durch die vorgekühlten Branchen einer Zange auf eine Platte von nicht mehr als 2 mm Dicke gequetscht wird (s. Methoden).

2. Lyophilisierung

Eine Veränderung des metabolischen Zustandes im Gewebe während der Gefriertrocknung konnte durch Messung der Spiegel einiger energiereicher Substrate weitgehend ausgeschlossen werden. Deshalb soll die Bedingung für eine effektive Lyophilisierung hier nur kurz rekapituliert werden.

Chemische Reaktionen der Substrate sind zu verhindern. Die Bedingung dafür ist, daß während des Gefriertrocknens keine flüssige Phase im Gewebe auftritt. Übersteigt die Temperatur des gefrorenen Gewebes -30°C , so muß mit der Bildung eines eutektischen Gemisches intrazellulärer Ionen gerechnet werden (Cerkasow, 1966). Darüber hinaus bilden sich bereits bei einer Temperatur von mehr als -50°C Makrokristalle, welche die Gewebsstrukturen schädigen und dadurch die spätere Zellfraktionierung erschweren können (Cerkasow, 1966).

Das gefrorene Pulver muß aus diesen Gründen bis zur Lyophilisierung bei möglichst tiefer Temperatur, am besten unter flüssigem Stickstoff, aufbewahrt werden. Bei der Gefriertrocknung wird das Material auf -60°C gebracht. Es ist darauf zu achten, daß während des Vorganges diese Temperatur nicht überschritten wird, d. h. der Dampfdruck im Lyophilisator darf 2×10^{-3} Torr nicht übersteigen.

Nach abgeschlossener Gefriertrocknung, also nach vollständigem Wasserentzug, kann das Pulver kurzzeitig auf Zimmertemperatur gebracht werden. Nun ist aber darauf zu achten, daß keine Luftfeuchtigkeit in das hygroskopische Material eindringen kann.

3. Homogenisierung

In den vorangegangenen Veröffentlichungen über nichtwässrige Zellfraktionierung wurden verschiedene Techniken der Homogenisation beschrieben: Eine Kugelmühle mit Glasperlen (Behrens, 1932), ein Glasschliffpotter (Cerkasow, 1966) und schließlich ein schnell rotierendes Messer (Heber, 1960 a). Unsere Überlegungen gingen davon aus, daß eine Kugelmühle, die für die Präparation von Kernen geeignet ist, die Zellstruktur zur Gewinnung von Mitochondrien nicht hinreichend zerkleinert. Bei der vorhergehenden Präparation von Mitochondrien (Cerkasow, 1966) konnten in keiner der Fraktionen intakte Kerne gefunden werden. Diese Tatsache wies darauf hin, daß möglicherweise auch bei der für unsere Zwecke notwendigen Homogenisation die strukturelle Integrität der Kerne geopfert werden müßte. Diese Vermutung sollte sich später bestätigen. Andererseits hielten wir ein schnell

rotierendes Messer zwar geeignet für die Zerkleinerung der Pflanzenzelle mit ihrer harten Zellwand, jedoch zunächst nicht für die Rattenleber.

Entsprechend verwendeten wir anfangs einen Glasschliffpotter. Wie gezeigt wurde, waren jedoch die Enzyme bei dieser Methode erheblichen Aktivitätsverlusten ausgesetzt, weshalb der Schliffpotter nicht befriedigen konnte.

Um eine geeignetere Methode zu erreichen, wurde nun auf die Homogenisierung mittels eines rotierenden Messers zurückgegriffen. Es zeigte sich, daß die Enzymaktivitäten konstant bleiben.

Entsprechend unseren anfänglichen Befürchtungen konnte elektronenmikroskopisch ein teilweises Zerbrechen der Mitochondrien durch die Bühler-Homogenisierung nachgewiesen werden. Der erwartete Nachteil, die Erschwerung der nachfolgenden Fraktionierung durch dieses Zerbrechen, stellte sich jedoch nicht ein. Im Gegenteil zeigte sich, daß die Größe der Partikel keine Rolle spielt, da ja die Trennung rein nach der spezifischen Dichte der Partikel erfolgt. Ferner wird auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar, daß das Zytoplasma praktisch gar nicht vollständig von den Mitochondrien zu trennen ist. Immer wieder finden sich den Mitochondrien adhärente Zytoplasmateile. Je stärker aber die Mitochondrien selbst zerkleinert werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß von Zytoplasma freie Mitochondrienteile entstehen. Der erwartete Nachteil erwies sich demnach als ein Vorzug.

Intakte Zellkerne sind selbst nach kurzer Homogenisierung (10 Min.) morphologisch nicht nachzuweisen, was für eine schnelle und voll-

ständige Zertrümmerung spricht. Bei der Trennung auf Grund der Dichte ist dies jedoch, entsprechend dem teilweisen Zerschneiden der Mitochondrien, völlig belanglos.

Hervorzuheben ist vor allem die erstaunliche Festigkeit des lyophilisierten Gewebes und die damit verbundene Schwierigkeit der Homogenisation verglichen mit den Bedingungen beim Arbeiten in wässrigen Medien. Auf diesen Umstand weisen auch die vorangegangenen Veröffentlichungen auf diesem Gebiet hin (z.B. Cerkasow, 1966).

4. Fraktionierung

Für die Auftrennung des homogenisierten Materials erschien nur die Trennung nach der Dichte aussichtsreich. Auch in den vorangegangenen Arbeiten wurde die Differentialzentrifugation nur zur Reinigung von durch Gleichgewichtszentrifugation gewonnenen Fraktionen verwendet.

Wir versuchten zunächst eine der "Behrens-Technik" ähnliche Methode. Die Homogenatsuspension wird auf eine bestimmte Dichte gebracht; entsprechend Arbeiten über Zellkernisolierung (Behrens, 1932) liegt diese auch bei uns in der Gegend von 1,30 (0°C). Dann wird durch Zentrifugation in einen schwereren sedimentierten und einen leichteren obenauf schwimmenden Teil getrennt. Durch Wiederholung lassen sich vier Fraktionen mit verschiedenem Gehalt an Zellorganellen gewinnen.

Die Vorteile dieses Verfahrens sind seine leichte technische Durchführbarkeit, die Stabilität gegenüber zufälligen Einflüssen wie Erschütterung und Temperaturveränderung während der Arbeit und

die Möglichkeit der Handhabung von relativ großen Materialmengen. Unsere Absicht war, durch weitere Wiederholungen der Prozedur schließlich eine Fraktion reiner Mitochondrien zu erhalten. Bei unseren Experimenten zeigte sich jedoch, daß über eine gewisse Anreicherung von Organellen nicht hinausge-
langt werden konnte. Da aus unseren morphologischen Untersuchungen zudem immer klarer erhellte, daß vollständig von Zytoplasma befreite Mitochondrien praktisch nicht zu gewinnen waren, gaben wir diesen Versuch zugunsten einer anderen Methode auf.

Wir kamen zu dem Schluß, daß bereits Fraktionen mit einem untereinander verschiedenen Gehalt an Zellorganellen unseren Zwecken genügen würden. Dazu ist notwendig, in jeder Fraktion die spezifische Aktivität der für die verschiedenen subzellulären Partikel charakteristischen Leitenzyme zu bestimmen. Daraus ergibt sich der prozentuale Anteil des jeweiligen Zellorganells am Protein jeder einzelnen Fraktion. Mit Hilfe der so gewonnenen Zahlen läßt sich aus den ebenfalls in jeder Fraktion gemessenen Substratkonzentrationen die Substratkonzentration im reinen Zellorganell rechnerisch ermitteln (Genauerer bei: Elbers et al., 1974). Es wird also gewissermaßen mit Hilfe des "Verunreinigungsfaktors" eines Kompartiments in einer bestimmten Fraktion auf das reine Kompartiment rückgeschlossen.

Entsprechend wurde in den folgenden Experimenten die Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Die Organellenverteilung kann dabei durch die Gewinnung von mehr Fraktionen als bei der ersten Methode genauer durchschaut werden. Nachteile sind die Schwierigkeit, mit größeren Substanzmengen zu arbeiten, der größere technische Aufwand und die

stärkere Anfälligkeit gegenüber zufälligen Einflüssen wie Erschütterung und Temperaturveränderung. Diese Nachteile können jedoch durch vorsichtiges Handhaben und weitgehende Automatisierung der Vorgänge wie Schichten und Schneiden des Gradienten umgangen werden. Überdies zeigte sich später (Elbers et al., 1974), daß die Substanzmengen der einzelnen Fraktionen für weitaus die meisten Messungen durchaus genügen.

5. Analyse der Fraktionen auf ihren Gehalt an Zellorganellen

Die ersten Arbeiten auf nichtwässrigem Gebiet verwenden zur Identifizierung der gewonnenen Fraktionen die Mikroskopie (z.B. Behrens, 1932). Neben der Identifizierung der Organellen ist sehr leicht auch die Beurteilung ihrer strukturellen Integrität sowie ihrer Reinheit möglich. Dagegen kann der numerische Grad der Verunreinigung, wie er bei uns notwendig ist, nicht oder nur sehr schwer angegeben werden.

Die Beschäftigung mit einem submikroskopischen Partikel wie dem Mitochondrion erschwert diese einfache Methode, da auf die Elektronenmikroskopie zurückgegriffen werden muß. Andererseits wird bei der Zellfraktionierung die Bestimmung von Leitenzymen allgemein angewandt, auch bei nichtwässriger Technik (Siebert und Humphrey, 1965; Cerkasow, 1966). Die Messung von Leitenzym-Aktivitäten erlaubt überdies die zahlenmäßige Angabe des Reinheitsgrades eines Organells in einer bestimmten Fraktion (s.o.).

Entsprechend den Vorgängen (Cerkasow, 1966) bestimmten wir zunächst Succinatdehydrogenase als

Leitenzym für Mitochondrien. Bei unseren Versuchen erlaubte die Succinatdehydrogenase-Aktivität eine grobe Bestimmung des Mitochondrienanteils in jeder Fraktion. Offenbar wird das Enzym jedoch durch die vorangegangene Prozedur so weit geschädigt, daß die vergleichsweise niedrigen Restaktivitäten für eine routinemäßige Analyse nicht ausreichen. Die Glutamatdehydrogenase erwies sich als stabiler, für unsere Zwecke als weitaus geeigneter. Die gewählten Leitenzyme und ihre Verteilung werden oben ausführlich beschrieben. Die Forderung der Stabilität der Enzyme ist erfüllt. Die durch Enzymanalyse gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den morphologischen überein, mit der Einschränkung, daß intakte Zellkerne nirgends zu finden sind (s.o.).

6. Ausblick

In der zwischen experimentellem Teil und Niederschrift dieser Arbeit verstrichenen Zeit sind wesentliche neue Ergebnisse gewonnen worden. Diesbezüglich darf auf eine zusammenfassende Veröffentlichung hingewiesen werden (Elbers et al., 1974). Es gelang Herrn R. Elbers und Frau S. Soboll, welche die vorliegenden Untersuchungen unter Anleitung von Herrn Dr. Heldt weiterführten, die von mir zugrundegelegte Methode in vielen Schritten zu vereinfachen und so zu standardisieren, daß sie als routinemäßige Labortechnik in die Stoffwechselforschung Eingang finden konnte. Es wurden die mitochondrialen und zytoplasmatischen Spiegel der energiereichen Substrate bestimmt und gezeigt, daß die an wässrigen Präparationen gewonnenen Erkenntnisse (z.B. Heldt, 1972; Pfaff, Heldt und Klingenberg, 1969; Klingenberg, Wulf und Heldt, 1969) mit den aus unserer Methode gezogenen weitgehend in Übereinstimmung stehen.

In der weiteren Zukunft bietet sich die Möglichkeit, den Einfluß vielfältiger Bedingungen während der Perfusion zu studieren. Die Technik könnte zum Beispiel helfen, den Einfluß von Anoxie und verschiedenen Substraten und Chemikalien in der Perfusionsflüssigkeit auf den metabolischen "in-vivo-Zustand" der verschiedenen Zellkompartimente aufzuheilen. Auf diese Weise könnte sie selbst in die pharmakologische Forschung Eingang finden.

METHODEN

1. Gewinnung des Ausgangsmaterials

a) Leberperfusion

Die Perfusion der Rattenleber wurde hämoglobin-frei durchgeführt (Scholz und Bücher, 1965; Scholz et al., 1969; Scholz, Hansen und Thurman, 1973; Scholz, 1968). Verwendet wurde albuminhaltige Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung s. Tab. 4). Sie wurde über eine Fritte im Gegenstrom mit einem Gemisch von 95% O_2 und 5% CO_2 ("Carbogen-Gas", Fa.Linde, München) aufgesättigt und mittels eines Thermostaten auf einer Temperatur von $37^{\circ}C$ gehalten. Die Perfusionsflüssigkeit wurde bei einer Durchströmungsgeschwindigkeit von 30 ml/Min. über eine Rollpumpe in die Pfortader eingeleitet.

Tab. 4 : Zusammensetzung der verwendeten albuminhaltigen Krebs-Henseleit-Lösung

Na^{+}	327	mg%
K^{+}	23	mg%
Ca^{++}	10	mg%
Mg^{++}	2,9	mg%
Cl^{-}	454	mg%
HPO_4^{--}	11	mg%
SO_4^{--}	11,4	mg%
HCO_3^{-}	54	mg%
pH	7,4	
Rinderserumalbumin 4 g%		

Fig. 6 zeigt die schematische Darstellung der beschriebenen Anordnung zur Rattenleberperfusion.

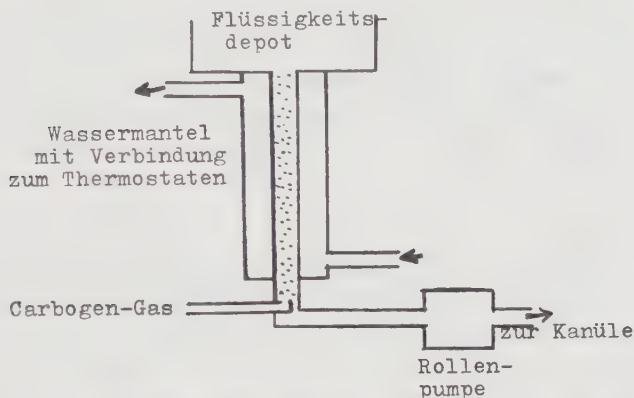


Fig. 6 : Schematische Darstellung der verwendeten Perfusions-Apparatur

Als Versuchstiere wurden ad lib. gefütterte weiße männliche Ratten der Gattung Wistar II mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g verwendet. Durch intraperitoneale Injektion von 0,4mg Nembutal^R wurden sie in Narkose versetzt. Dann wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Pfortader aufgesucht. Die in diese einmündenden Venen wurden unterbunden, die Vena portae mit der Schere eröffnet und eine passende Kanüle aus Polyäthylen in das Lumen eingeführt und fixiert. Während der Einföhrns der Kanüle war die Rollenpumpe eingeschaltet, um eine intermittierende Ischämie zu vermeiden. Die Verdrängung des Blutes durch die Perfusionslösung zeigte sich durch eine innerhalb weniger Sekunden eintretende Farbänderung des Organs von dunkel-rotbraun nach gelblich an. Die durchströmte

Leber wurde nun von ihrer Umgebung freipräpariert und unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Situs gefrier-gestoppt. Der Gefrierstop muß sofort erfolgen, damit eine teilweise Ischämie durch Zentralisierung des Kreislaufs im Organ infolge venösen Druckabfalles bei Trennung von der Vena cava vermieden wird (Scholz, 1968).

b) Gefrierstop

Der Gefrierstop wurde durch schlagartiges Einfrieren des Lebergewebes zwischen zwei Aluminiumblöcken mit einem Durchmesser von 11 cm und einer Dicke von 4 cm erreicht. Die Blöcke bildeten die Branchen einer an den Griffstücken isolierten Zange und waren in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Um die kalten Oberflächen zu vergrößern, waren konzentrische Ringe mit trapezoidem Querschnitt in das Aluminium eingeschliffen auf eine Weise, daß die beiden Platten mit einem Abstand von 1mm aufeinander passten (Wollenberger, Krause und Wahler, 1958; Hohorst, Kreutz und Bücher, 1959). So ist kein Teil des gefrorenen Gewebes mehr als 1 mm von dem kühlenden Metall entfernt und ein wirkungsvoller Gefrierstop sicher (Grunst, 1968).

Die gewonnene Platte tiefgefrorenen Lebergewebes wurde in einen Kryostaten eingebracht (es diente hierzu eine Tiefkühltruhe der Fa.Linde mit einer Temperatur von -30°C) und dort in einer Reibschale unter flüssigem Stickstoff fein pulverisiert.

2. Vorbereitung der Proben zum Test

Als Ausgangsmaterial für Enzym- bzw. Substrattests diente das gefrorene Leberpulver bzw. das Lyophilisat. Soweit das Material bereits homogenisiert oder fraktioniert, also in organischem Medium suspendiert war, mußte zunächst das nichtwässrige Lösungsmittel entfernt werden. Dazu wurden die Proben in Schliffgläser aufgenommen und bei Eiskühlung in einem Rotationsverdampfer (Fa. Büchi/Schweiz, Typ KR v 65/30) unter Ölpumpenvakuum von dem organischen Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde sodann wie folgt zum Test aufbereitet.

Vorbereitung zum Enzymtest:

Zum Enzymtest wurde das Material in 50 mM Phosphatpuffer vom pH 7,5 aufgenommen und dreimal je 5 Sekunden lang mit Intervallen von 15 Sekunden bei Eiskühlung durch Ultraschall homogenisiert (Gerät: Sonicator der Fa. Branson, Connecticut/USA). Die entstandene Suspension sedimentierte während mehrerer Tage nicht. Bis zum Test wurde sie eingefroren und bei -20°C gelagert.

Vorbereitung zum Substrattest:

Zum Substrattest wurde das Material in 6%iger Perchlorsäure aufgenommen, welche 40 Vol.% Äthanol als Gefrierschutz enthielt. Dadurch konnte der Säurestop bei tiefer Temperatur (-30°C) durchgeführt werden. Die entstandene Suspension wurde mit dem Ultraturaxhomogenisator (Fa. Janke und Kunkel, Staufen) zunächst 3 Sekunden lang grob und weiter 30 Sekunden lang durch Ultrabeschallung (s.o.) fein homogenisiert. Beide Schritte wurden unter Eiskühlung

durchgeführt. Das denaturierte Eiweiß wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 20 000 rpm im Winkelrotor SSL einer Sorvall-Zentrifuge RC2B sedimentiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot abgenommen und an einer pH-Elektrode (pHM51, Radiometer Copenhagen/Dänemark) mit 4 N- K_2CO_3 -Lösung neutralisiert. Der entstandene $KClO_4$ -Niederschlag wurde wie oben abzentrifugiert. Die so erhaltene Lösung wurde bis zur Substratbestimmung eingefroren und bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

3. Optisch-enzymatische Bestimmungen

Alle optischen Tests wurden im Eppendorf-Photometer bei $25^{\circ}C$ durchgeführt.

Die Wellenlänge ist bei jedem Test angegeben.

Die genannten Konzentrationen beziehen sich auf den reinen Stoff, errechnet aus der typischen Analyse des benützten Präparates.

a) Bestimmung der Enzymaktivität

Glutamatdehydrogenase 1.4.1.2

Die Bestimmung wurde leicht modifiziert durchgeführt nach dem entsprechenden Kapitel in "Methoden der enzymatischen Analyse" (Schmidt, 1970).

Wie bei den folgenden Bestimmungen werden nur die Endkonzentrationen im Test angegeben.

Triäthanolaminpuffer	50	mM, pH 8,0
EDTA	3,5	mM
Ammoniumacetat	140	mM
NADH	0,2	mM
α -Ketoglutarat	4	mM (Start)

Testvolumen 1 ml, Messung bei 366 nm.

Lactatdehydrogenase 1.1.1.27 (nach Bergmeyer und
Bernt, 1970)

Phosphatpuffer	50	mM, pH 7,5
NADH	0,2	mM
Natriumpyruvat	0,5	mM (Start)

Testvolumen 1 ml, Messung bei 366 nm.

3-Phosphoglyceratkinase 2.7.2.3 (modifiziert nach
Bergmeyer, 1970)

Triäthanolaminpuffer	80	mM, pH 7,6
EDTA	1	mM
Magnesiumsulfat	2	mM
3-Phosphoglycerat	14	mM
NADH	0,2	mM
Glycerinaldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	80	γ/ml
ATP	1,6	mM (Start)

Testvolumen 0,6 ml, Messung bei 366 nm.

NADPH-Cytochrom c - Reduktase 1.6.2.4 (nach Hogeboom
und Schneider, 1950, und Masters et al., 1967)

Phosphatpuffer	40	mM, pH 7,5
Kaliumcyanid	1	mM
Cytochrom c	0,2	mM
NADPH	0,2	mM (Start)

Testvolumen 0,5 ml, Messung bei 546 nm.

NMN-Adenylyltransferase 2.7.7.1 (nach Kornberg 1955,
und Klingenberg, 1970)

Vorinkubation:

Glycylglycinpuffer	50	mM, pH 7,4
Magnesiumchlorid	12,5	mM
ATP	1,6	mM
NMN	4,5	mM

30 Minuten lang Inkubation bei 37°C, Eiweißdenaturierung bei 100°C, Abzentrifugieren des Eiweißes und aus dem Überstand Übertragung eines Aliquot in den endgültigen Test.

Bestimmung des während der Vorinkubation entstandenen NAD:

Natriumdiphosphat	52,8 mM, pH 8,7
Semicarbazid	52,8 mM
Glycin	16 mM
Äthanol	150 mM
Alkoholdehydrogenase aus Hefe	28γ/ml (Start)
Testvolumen	0,7 ml, Messung bei 366 nm.

b) Substratbestimmung

Adenosintriphosphat (nach Lamprecht und Trautschold, 1970)

Triäthanolaminpuffer	25 mM, pH 7,5
Magnesiumchlorid	5 mM
Glucose	40 mM
NADP	0,3 mM
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe	1,4γ/ml
Hexokinase aus Hefe	2,8γ/ml (Start)
Testvolumen	0,7 ml, Messung bei 366 nm.

Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat (nach Jaworek et al., 1970)

Triäthanolaminpuffer	70 mM, pH 7,5
Magnesiumchlorid	2 mM
Kaliumchlorid	5 mM
Phosphoenolpyruvat	0,8 mM
NADH	0,2 mM
Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel	14γ/ml
Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	14γ/ml (Start auf ADP)
Adenylatkinase aus Schweinemuskel	14γ/ml (Start auf AMP)
Testvolumen	0,7 ml, Messung bei 366 nm.

4. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde bei den Versuchen mit diskontinuierlicher Fraktionierung der Biuret-Test (Bode et al., 1968) benützt, bei den Experimenten mit Dichtegradientenzentrifugation die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951).

a) Biuretbestimmung

Zur Eiweißfällung wurden 0,2 ml wäßrigen Extraktes in 2 ml Wasser aufgenommen und mit 0,2 ml 50%iger Trichloressigsäure das Eiweiß denaturiert.

Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation (Zentrifuge vom Typ UJ1 der Fa. Heräus-Christ, Osterode im Harz) sedimentiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Gläser 30 Minuten lang zum Trocknen mit der Öffnung nach unten aufgestellt. Dann wurden 2,5 ml Biuret-Reagens (Zusammensetzung s.u.) zugegeben und das Eiweiß durch Schütteln darin gelöst. Die Lösung wurde mit 2,5 ml Wasser verdünnt und zum Beseitigen der Lipidtrübung mit etwa 3 ml Äther ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde nochmals kurz zentrifugiert und der überstehende Äther mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Messung der Extinktion bei 546 nm und hieraus Berechnung der Proteinmenge.

Zusammensetzung der Biuretlösung:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,3 g%
Na-K-Tartrat	0,9 g%
NaOH	0,8 g%
KJ	0,5 g%

b) Bestimmung nach Lowry

Stammlösungen:

1. NaOH 0,1 N

Na₂CO₃ 2 g%

2. CuSO₄ x 5 H₂O 0,5 g%

Na-K-Tartrat 1 g%

3. Folin-Ciocalteus Phenolreagens 1 N

Vor jedem Test ist eine frische Lösung aus 49 Teilen Lösung 1 und 1 Teil Lösung 2 zu bereiten. Zu 2 ml dieser Lösung wird der wäßrige Extrakt pipettiert. Die Mischung wird kurz geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann werden unter heftigem Schütteln 0,2 ml Lösung 3 zugefügt. Diese Mischung wird erneut 20 Minuten inkubiert. Dann wird ihre Extinktion bei 578 nm bestimmt und daraus der Proteingehalt errechnet.

Die Messung aller Proben wird in der gleichen Küvette vorgenommen. Vorher wird diese mit einem Teil jeder neuen Probe ausgespült.

Zur Eichung werden neben jeder neuen Serie zwei Blindwerte sowie jeweils zwei Proben aus Lösungen mit bekanntem Gehalt 100%ig reinen Serumalbumins vom Rind mitgemessen.

Chemikalien

Die Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Biochemische Reagentien wurden ausschließlich von der Fa. Boehringer, Ingelheim, geliefert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Allfrey, V., Stern, H., Mirsky, A.E. und Saetren, H.,
J.Gen.Phys. 35, 529-554 (1952)
- Allfrey, V., Mirsky, A.E., und Osawa, S., J.Gen.Phys.
40, 451 (1957)
- Behrens, M., Z.phys.Chemie 209, 59-74 (1932)
- Behrens, M., Artikel in: Aberhaldens Handb.d.biol.
Arbeitsmethoden, Abt.V, Teil 10, 1363 (1938)
- Behrens, M., Z.phys.Chemie 220, 97-105 (1933)
- Behrens, M., Z.phys.Chemie 232, 263-269 (1935)
- Behrens, M., Z.phys.Chemie 253, 185-192 (1938)
- Behrens, M., Z.phys.Chemie 258, 27-32 (1939)
- Behrens, M., Artikel in Biochemisches Taschenbuch,
1.Auflage, S.910, Springer Verlag, Heidelberg
1956
- Behrens, M., Experientia 10, 508 (1954)
- Behrens, M., und Thalacker, R., Naturwissenschaften
44, 621 (1957)
- Bell, L.G.E., Intern.Rev.Cytology 1, 35-63 (1952)
- Bergmeyer, H.-U. (Herausgeber), Methoden der enzyma-
tischen Analyse, Bd. 1, S. 463-464, 2.Auflage,
Verlag Chemie Weinheim 1970
- Bergmeyer, H.-U., und Bernt, E., Artikel in: Metho-
den der enzymatischen Analyse, 2.Auflage, Bd.I,
S. 533-538, Verlag Chemie Weinheim 1970
- Bird, J.F., Porter, H.K., und Stocking, C.R., BBA 100,
366-375 (1965)
- Bode, Ch., Goebell, H., und Stühler, E., Z.f.klin.
Chemie u. klin.Biochemie 6, 418-422 (1968)
- Bulivant, S., J.Biophys.Biochem.Cytol. 8, 639-647
(1960)
- Cerkasow, J. und Foustka, M., Acta Universitatis
Carolinae-Biologica Vol.1966 No 3/4 Pag.149-
169 (1966)
- Conover, T.E., und Siebert, G., BBA 99, 1-12 (1965)
- Dounce, A.L., Tishkoff, G.H., Barnett, S.R., und
Freer, R.M., J.Gen.Phys. 33, 629-642 (1950)
- Elbers, R., Heldt, H.-W., Schmucker, P., Soboll, S.
und Wiese, H., Z.phys.Chemie 355, 378-393
(1974)

- Elbers, R., Heldt, H.-W., Schmucker, P., und Wiese, H.,
Z.phys.Chemie 353, 702-703 (1972)
- Feulgen, R., und Behrens, M., Z.phys.Chemie 231,
85-87 (1935)
- Feulgen, R., und Behrens, M., und Mahdihassan, S.,
Z.phys.Chemie 246, 203-211 (1937)
- Fischer, F., Siebert, G., und Adloff, E., Biochem.Z.
332, 131-150 (1959)
- Giannitsis, D., Kesselring, K., Schwarzhaupt, W.,
und Siebert, G., Z.phys.Chemie 348, 1133-1140
(1967)
- Grunst, J., Dissert.Med.Fakultät Univ.München (1968)
- Hammel, C.L., und Bessmann, S.P., J.Biol.Chem. 239
2228 (1964)
- Heber, U., Ber.Dt.bot.Ges. 70, 371-382 (1957)
- Heber, U., Z.Naturforschung 15b, 95-99 (1960) a
- Heber, U., Z.Naturforschung 15b, 100-109 (1960) b
- Heber, U., und Tyszkiewicz, E., J.exp.Bot. 13, 185-
200 (1962)
- Heber, U., und Willenbrink, J., Naturwissenschaften
50, 506 (1963)
- Heber, U., und Willenbrink, J., BBA 82, 313-324 (1964)
- Heber, U., Santarius, K.A., Urbach, W., und Ullrich, W.,
Z.Naturforschung 19b, 576-587 (1964)
- Heber, U., und Santarius, K.A., BBA 109, 390-408
(1965)
- Heber, U., Santarius, K.A., Hudson, M.A., und Hallier,
U.W., Z.Naturforschung 22b, 1189-1199 (1967)
- Heber, U., Hallier, U.W., und Hudson, M.A., Z.Natur-
forschung 22b, 1200-1215 (1967)
- Heber, U., Proc.of the intern.Symposium on Transport
in Higher Plants, Reinhardtbrunn, 1968
- Heber, U., und Santarius, K.A., Z.Naturforschung 25b,
718-728 (1970)
- Heldt, H.-W., Morphologische und funktionelle Kom-
partmentierung des Zellstoffwechsels. In:
Gauer-Kramer-Jung, Physiologie des Menschen
Bd.I, S. 225-269, 1.Aufl.München 1972
- Hogeboom, G.H., und Schneider, W.C., J.Biol.Chem.186,
417-427 (1950)
- Hogeboom, G.H., und Schneider, W.C., J.Biol.Chem.197,
611-620 (1952)

- Hohorst,H.-J., Artikel in: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl.,Bd.II,S.1200-1204.
Verlag Chemie, Weinheim 1970
- Hohorst,H.-J., Artikel in: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl.,Bd.II,S.1425-1429.
Verlag Chemie, Weinheim 1970
- Hohorst,H.-J., Kreutz,F.H.,und Bücher,T., Biochem. Z. 332, 18-46 (1959)
- Itah,S., und Schwarz,J.L., Am.J.Physiol. 188, 490-498 (1957)
- Jaworek,D., Gruber,W.,und Bergmeyer H.U., Artikel in: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl. Bd.II,S.2051-2053. Verlag Chemie, Weinheim 1970
- Kay,E.M.R., Smellie,R.M.S., Humphrey,G.F.,und Davidson,J.N., Biochem.J. 62, 160-168 (1956)
- Keir,H.M., Smellie,R.M.S.,und Siebert,G.,Nature 196, 752-754 (1962)
- Kirkham,W.R.,und Thomas,L.E., J.Biol.Chem. 200, 53-57 (1952)
- Klingenberg,M., Essays in Biochemistry 6, 119-159, Academic Press,London u.New York 1970
- Klingenberg,M., Wulf,R.,und Heldt,H.-W., Febs Symposium 00, 59-77 (1969)
- Klingenberg,M., Artikel in: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl.,Bd.II, S.1975-1990.
Verlag Chemie, Weinheim 1970
- Kopac,M.J., Trans.N.Y.Acad.Sci. 17, 257 (1955)
- Kornberg,A., Methods in Enzymol. 2, 670-672 (1955)
- Krebs,H.A.,und Henseleit,K., Z.phys.Chemie 210, 33-66 (1932)
- Lamprecht,W.,und Trautschold,J., Artikel in: Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Aufl. Bd.II,S.2024-2033. Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- Langendorf,H., Siebert,G., Lorenz,J., Hannover,R., und Beyer,K., Biochem.Z. 335, 273 (1961)
- Langendorf,H., Siebert,G.,und Nitz-Litzow,D., Nature 204, 888 (1964)
- Langendorf,H., Siebert,G., Kesselring,K.,und Hannover,R., Nature,209, 1130-1131 (1966)
- Long,C., Biochemists Handbook p.677, E.und F.Spon Ltd, London (1961)
- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L.,und Randall, R.J., J.Biol.Chem. 193, 265-275 (1951)

- Luyet, B., Ann.NY. Acad.Sci. 85, 549-569 (1959)
- Masters, B.S., Williams, Ch.H., und Kamin, H., Artikel
in: Methods in Enzymology, 1.Aufl.Bd.X,
S.566-573, Academic Press New York 1967
- Ongun, A., und Stocking, R., Plant Physiol. 40, 825-
831 (1965)
- Osawa, S., Allfrey, V.G., und Mirsky, A.E., J.Gen.Phys.
40, 491 (1957)
- Oster, G., und Pollister, A.W., Artikel in: Physical
techniques in Biological Research, 1.Aufl.
S.339-352. Academic Press Inc. New York 1956
- Pfaff, E., Heldt, H.-W., und Klingenberg, M., European
J.Biochem. 10, 484-493 (1969)
- Ray, L.R., Blackwell Sci.Pub. 1959, 40-62
- Shakoori, A.R., Romen, W., Oelschläger, W., Schlatterer,
B., und Siebert, G., Z.phys.Chemie 353, 1735-
1748 (1972)
- Shakoori, A.R., Schlatterer, B., und Siebert, G., Z.phys.
Chemie 353, 758 (1972)
- Santarius, K.A., Heber, U., Ullrich, W., und Urbach, W.,
BBRC 15, 139-146 (1964)
- Santarius, K.A., und Heber, U., BBA 102, 39-54 (1965)
- Santarius, K.A., und Heber, U., Naturwissenschaften 52,
140 (1965)
- Santarius, K.A., und Stocking, C.R., Z.Naturforschung
24b, 1170-1179 (1969)
- Schmidt, E., Artikel in: Methoden der enzymatischen
Analyse, 2.Aufl., Bd.I, S.607-613. Verlag Chemie
Weinheim 1970
- Schollmeyer, P., und Klingenberg, M., Biochem.Z. 335
426-439 (1962)
- Scholz, R., und Bücher, T., Artikel in: Control of
Energy Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W.,
und Williamson, J.R. Herausgeber) S. 393-414.
Academic Press, New York 1965
- Scholz, R., Hansen, W., und Thurman, R.G., Eur.J.Biochem.
38, 64-72 (1973)
- Scholz, R., Thurman, R.G., Williamson, J.R., Chance, B.,
und Bücher, T., J.Biol.Chem. 244, 2317-2324
(1969)
- Siebert, G., Biochem.Z. 334, 369-387 (1961)
- Siebert, G., und Adloff, E., Biochem.Z. 333, 202-204
(1960)

- Siebert, G., Bässler, K.-H., Hannover, R., Adloff, E.,
und Beyer, R., Biochem. Z. 334, 388-400 (1961)
- Siebert, G., Artikel in: Biochemisches Taschenbuch
2. Aufl. Bd. II, S. 541-546. Springer Verlag,
Heidelberg 1964
- Siebert, G., und Hannover, R., Biochem. Z. 339, 162-
174 (1963)
- Siebert, G., und Humphrey, G.B., Advances in Enzymology
27, 239-288 (1965)
- Siebert, G., Exp. Cell. Res. Suppl. 9, 389-417 (1963)
- Siebert, G., und Humphrey, G.B., Z. phys. Chemie 340
51-72 (1965)
- Siebert, G., Langendorf, H., und Hannover, R., Z. phys.
Chemie 343, 101-115 (1965)
- Siebert, G., Artikel in: Meth. in Cancer Res. Vol. III,
47-59; Vol. II, 287-304 (1967)
- Siebert, G., Stotz, E., und Florkin, M., Artikel in:
Comprehensive Biochemistry, 1. Aufl. Bd. XXIII,
S. 1, Elsevier, Amsterdam 1968
- Siebert, G., Naturwissenschaften 57, 119-124 (1969)
- Siebert, G., Sub-Cell. Biochem. 1, 277-292 (1972)
- Stephenson, J. L., J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl. 2,
45-52 (1956)
- Stern, H., Allfrey, V., Mirsky, A. E., und Saetren, H.,
J. Gen. Phys. 35, 559-578 (1952)
- Stern, H. und Mirsky, A. E., J. Gen. Phys. 36, 181 (1952)
- Stern, H. und Mirsky, A. E., J. Gen. Phys. 37 177-187
(1953)
- Stern, H., und Timonen, S., J. Gen. Phys. 38, 41-52
(1955)
- Stocking, C. R., Plant Physiol. 34, 56-66 (1959)
- Stocking, C. R., Williams, G. R., und Ongun, A.,
BBRC 10, 416-421 (1965)
- Thalacker, R., und Behrens, M., Z. Naturforschung 14b,
443-446 (1959)
- Ullrich, W., Urbach, W., Santarius, K. A., und Heber U.,
Z. Naturforschung 20b, 905-910 (1965)
- Urbach, W., Hudson, M. A., Ullrich, W., Santarius, K. A.,
und Heber, U., Z. Naturforschung 20b, 890-898 (1965)
- Williamson, M. B., und Gulick, A., J. Cell. and Comp.
Phys. 20, 116-118 (1942)
- Wollenberger, A., Krause, E. G., und Wahler, B. E.,
Naturwissenschaften 45, 294 (1958)

Zörlein, V., Langendorf, H., Hannover, R., Schulte, S.,
und Siebert, G., Z. phys. Chemie 350, 1683-1685
(1969)

LEBENS LAUF

Ich, Peter Johann Philipp Schmucker, wurde am 9. Oktober 1947 als Sohn des Installateurs Walter Schmucker und seiner Ehefrau Emilie in Nürnberg geboren. Im September 1954 trat ich in die Volksschule ein, von welcher ich im September 1958 in das humanistische Neue Gymnasium Nürnberg überwechselte. Im Juli 1967 bestand ich das Abitur und wurde im November des gleichen Jahres in die Stiftung Maximilianeum in München aufgenommen, wo ich für die Zeit meines Studiums der Medizin verblieb. Im Oktober 1968 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, im April 1970 die ärztliche Vorprüfung und im August 1973 das medizinische Staatsexamen. Im August 1973 heiratete ich. Die Approbation erlangte ich nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit im September 1974. Seit Oktober 1974 bin ich im Rahmen meines Wehrdienstes im Bundeswehrkrankenhaus München klinisch tätig.

